

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: **CORDERO PÉREZ, JOSÉ CARLOS**
D.N.I./PASAPORTE: ******3312C**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D412-CIENCIAS FORENSES**
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **INSTITUTO UNIVERSITARIO EN CIENCIAS POLICIALES**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 15/06/18, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **GONZALO PÉREZ SUÁREZ**.

Sobre el siguiente tema: **EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS. SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL**

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): **sobresaliente**

Alcalá de Henares, 15 de junio de 2018

EL PRESIDENTE



Fdo.: Dra. Rocío Filizola

EL SECRETARIO



Fdo.: Dr. Juan Soler

EL VOCAL

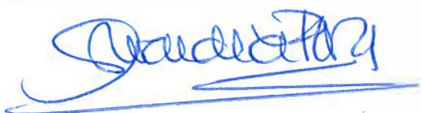


Fdo.: Dra. Eva Sacchi

Con fecha 16 de junio de 2018 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: José Carlos Cordero Pérez

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

La Dr. Eva Sacchi sustituye al Dr. Edward Jurkevitch como vocal en el Tribunal. El Dr. Edward Jurkevitch no ha podido estar presente por causa justificada.



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 16 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *CORDERO PÉREZ, JOSÉ CARLOS*, el día 15/06/18, titulada *EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS. SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 18 de julio de 2018
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



Javier de la Mata

Javier de la Mata de la Mata

Copia por e-mail a:

Doctorando: CORDERO PÉREZ, JOSÉ CARLOS

Secretario del Tribunal: JUAN SOLIVERI DE CARRANZA. C.U. Dpto. Biomedicina y Biotecnología.
UAH

Director/a de Tesis: GONZALO PÉREZ SUÁREZ



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

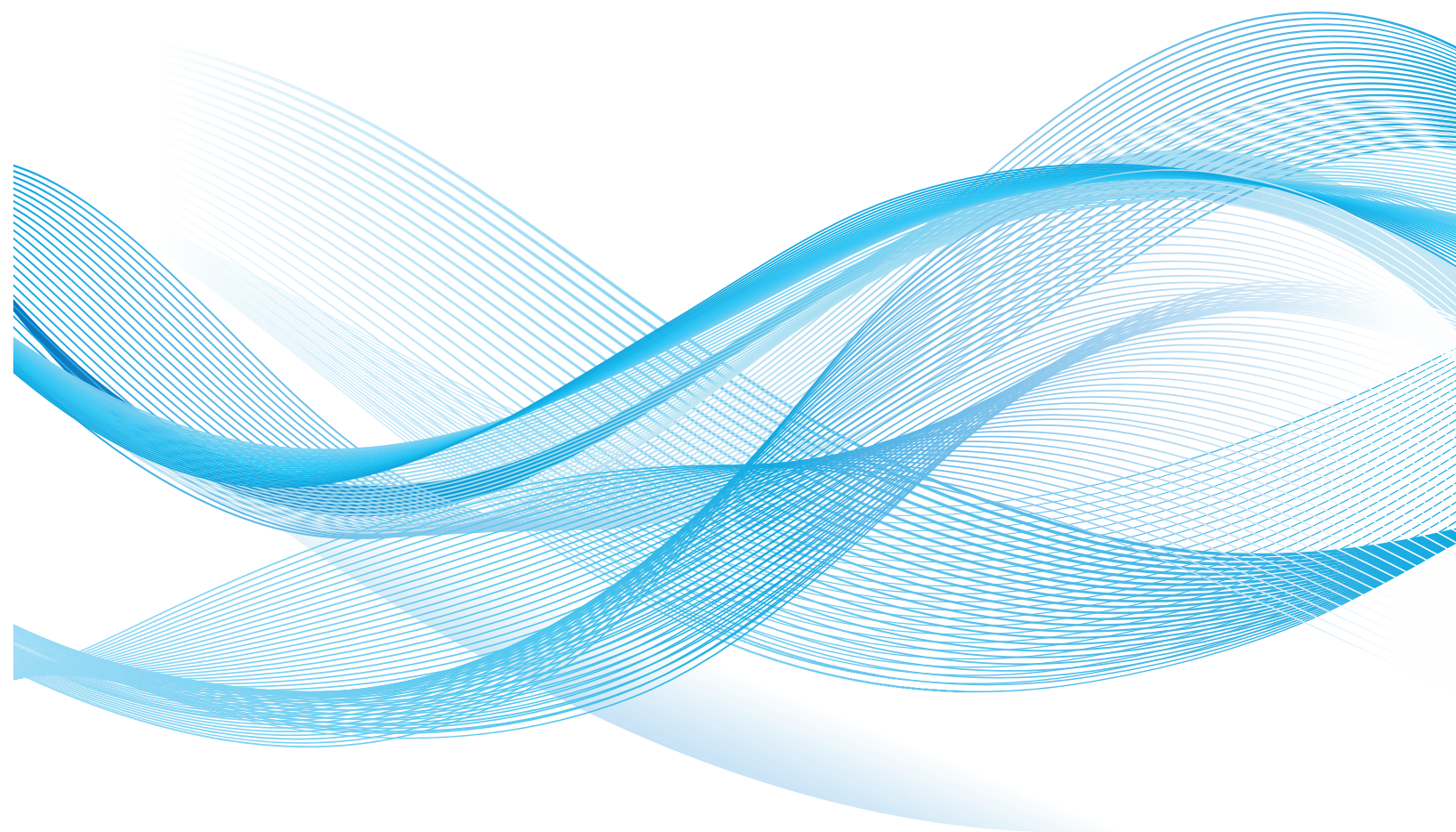
DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado
en Ciencias Forenses

EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS.
SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL.

Tesis Doctoral presentada por
D. JOSÉ CARLOS CORDERO PÉREZ
2017



SECRETARÍA DE ESTADO
DE SEGURIDAD

Programa de Doctorado en Ciencias Forenses

EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS. SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL.

Tesis Doctoral presentada por
D. JOSÉ CARLOS CORDERO PÉREZ

2017

CARMEN GARCÍA RUIZ, como coordinadora de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias Forenses,

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS. SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL” ha sido aprobado por la comisión académica del programa de doctorado en Ciencias Forenses.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 21 de diciembre de 2017.



Carmen García Ruiz

GONZALO PÉREZ SUÁREZ, Profesor Titular de Universidad, Investigador del Instituto de Universitario de Investigación en Ciencias Policiales (IUICP) y Director de la Tesis de D. José Carlos Cordero Pérez, Titulada *"El análisis criminalístico de la microbiología en suelos. Su aportación al proceso penal"*

INFORMA QUE:

El Doctorando **D. JOSÉ CARLOS CORDERO PÉREZ** ha desarrollado y alcanzado en la elaboración de su trabajo de Tesis Doctoral las competencias de comprensión y dominio de los métodos de investigación en campo de estudio de la Microbiología Forense aplicada a suelos, desarrollando una capacidad de análisis crítico y síntesis de ideas en este campo de la Microbiología, por lo que este Director de Tesis procede a dar su informe **FAVORABLE** para que se proceda a la presentación y defensa de la Tesis.

En Alcalá de Henares, a 27 de noviembre de 2017



Fdo.: Gonzalo Pérez Suárez

Director de la Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Ciencias Forenses

**EL ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO
DE LA MICROBIOLOGÍA EN SUELOS.
SU APORTACIÓN AL PROCESO PENAL**

**Tesis Doctoral presentada por
D. JOSÉ CARLOS CORDERO PÉREZ**

Alcalá de Henares, 2017

DIRECTOR: Dr. D. Gonzalo Pérez Suárez

TUTORA: Dr^a. D^a. Carmen Figueroa Navarro

AGRADECIMIENTOS

Cuando me senté a escribir este tradicional apartado de agradecimientos pensé que tenía claro lo que quería decir, resultando que no era así. Durante días no hice más que dudar, pero no sé en qué momento me acordé de que todo conocimiento nace de la duda y que aunque sin determinación nada es posible, sin la ayuda de los demás tampoco.

Por ello he de agradecer a mi mujer Guadalupe y a mis hijos Carlos y Marta la infinita paciencia y apoyo que me han mostrado durante estos cinco años. Ellos han sufrido las horas que no les he atendido y por eso les dedico especialmente esta Tesis.

También he de agradecer a Gonzalo Pérez Suárez y Carmen Figueroa Navarro su excelente trabajo de dirección y tutela. Queridos profesores y amigos: muchas gracias por vuestros magníficos consejos y enseñanzas. Espero haber estado a la altura.

Hablando de amigos y compañeros, quiero agradecer los ánimos, consejos, trabajo y colaboración de Enrique Santillana Reyes y Juan A. García Sabido, dos excelentes amigos, científicos y guardias civiles.

Agradezco a la Guardia Civil y muy especialmente al Servicio de Criminalística, como no puede ser de otra manera tras 17 años de servicio, todo el apoyo y cariño mostrados, así como darme la oportunidad de haber podido formarme y trabajar en esta herramienta forense que presento en la Tesis. Al final es el trabajo de equipo quien resuelve los crímenes.

A los Departamentos de Microbiología y Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá por su magnífica colaboración. Juan Soliveri, Luis Copa, Jorge Sanchís...muchísimas gracias. A mis colegas de la Universidad Hebrea de Jerusalén: Edouard Jurkevitch, Zohar Pasternak y del James Hutton Institute: Lorna Dawson, David Miller y Thomas Freitag mi respeto, admiración y agradecimiento.

A todos mis alumnos de prácticas: Andrés, Elena, Sara, Alba y especialmente Leticia Ureña por sus muchas, muchísimas placas de cultivo y el empeño y cariño demostrado en aprender.

En general, quiero dedicar este trabajo tanto a los que lo apoyaron como a los que dudaron de su pertinencia. En uno y otro caso me sirvieron de especial motivación.

Y finalmente un recuerdo para mi padre. Sé que estás conmigo papá.

Valdemoro (Madrid) a 26 de noviembre de 2017.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	13
CAPITULO I. REVISIÓN CIENTÍFICA DE LAS ANALÍTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA SU USO COMO PRUEBA PERICIAL.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. LA ACREDITACIÓN BAJO LA NORMA ISO 17025 Y SU INFLUENCIA EN LOS LABORATORIOS OFICIALES	17
2.1. ÁMBITO EXTRACOMUNITARIO.....	18
2.1.1. De carácter general.....	18
2.1.2. De carácter específico.....	19
2.2. ÁMBITO UNIÓN EUROPEA.....	19
2.2.1. Manual de Buenas Prácticas para la Aplicación de Métodos Moleculares para el examen forense de restos biológicos no humanos (Anexo G).....	20
3. NECESIDAD DE VALIDACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS MEDIANTE LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025:2005.....	22
3.1. CONTROLES DE CALIDAD. MARCADORES MOLECULARES (REVISIÓN GENERAL).....	23
3.1.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).....	23
3.1.2. MAAP (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación).....	24
3.1.3. STS (Sitios etiquetados por la secuencia) o SSLP (Polimorfismo de longitud en las secuencias discretas).....	24
3.2. REGISTROS Y TRAZABILIDAD DE LAS OPERACIONES REALIZADAS	25
3.3. CONCLUSIONES DE LOS ENSAYOS Y MÁRGENES DE FIABILIDAD (SEGÚN NORMA ISO 17025)	25
3.4. RECOMENDACIONES ENFSI SOBRE GENÉTICA NO HUMANA.....	26
3.4.1. Recomendaciones generales (ENFSI-APST).....	26
3.4.1.1. Validación.....	26
3.4.1.2. Validación biológica	27
3.4.1.3. Validación técnica.....	27
3.4.1.4. Validación de la interpretación	28
3.4.1.5. Estimación de la incertidumbre de medida	28
3.4.1.6. Evaluación de los datos	28
3.4.1.7. Interpretación de los datos.....	29
3.4.1.8. Base de datos de referencia	29
3.4.1.9. Individualización y base de datos poblacional	29
3.4.2. Recomendaciones (ENFSI-APST) particulares para el análisis del microbioma. Determinación de la composición de una población de microorganismos	30
4. LA ECOLOGÍA BACTERIANA COMO ANTECESOR DE LA PRUEBA MICROBIOLÓGICA EN CRIMINALÍSTICA	36
4.1. COMUNIDAD BACTERIANA Y HÁBITAT	34
4.2. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S (rDNA16S) COMO HERRAMIENTA DE ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE SUELOS.....	35
4.3. LA TÉCNICA T-RFLP COMO HERRAMIENTA APLICABLE A ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE SUELOS.....	36
4.4. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S BACTERIANO. INSTRUCCIÓN TÉCNICA IT-M-212 VALIDACIÓN EFECTUADA Y ACREDITACIÓN COMO HERRAMIENTA CRIMINALÍSTICA.....	36
4.4.1. Operaciones previas.....	36
4.4.2. Procesamiento de muestras.....	37

4.4.2.1. Preparación de muestras de suelo.....	37
4.4.2.2. Preparación de muestras de otros materiales.....	37
4.4.3. Medios de cultivo, reactivos y soluciones.....	37
4.4.4. Cultivo en medios sólidos generales	38
4.4.5. Análisis morfológico	38
4.4.6. Análisis genético	38
4.4.6.1. Extracción de ADN total bacteriano.....	38
4.4.6.2. Amplificación de fragmentos de ADN _r 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
4.4.6.3. Purificación de la PCR mediante columnas de filtración Centriscip®.....	39
4.4.7. Reacción de secuenciación.....	39
4.4.8. Purificación productos de secuenciación.....	40
4.4.9. Secuenciación automática	40
4.4.10. Identificación genética mediante ADN _r 16S. Controles internos de calidad	41
5. VALIDACIONES TÉCNICAS INICIALES Y ASPECTOS GENERALES DEL COTEJO MICROBIOLÓGICO MEDIANTE EL EMPLEO DEL PROTOCOLO IT-M-212	41
5.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS PROCEDENTES DE DIVERSOS MATERIALES Y SUELO	41
5.1.1. Validación de la identificación genética del material de referencia bacteriano.....	42
5.1.2. Validación de la recuperación e identificación bioquímica del material de referencia bacteriano en muestras de suelo.....	43
5.1.3. Recuperación e identificación bioquímica de material de referencia bacteriano en diferentes materiales.....	44
5.2. VALIDACIÓN DEL COTEJO ESTADÍSTICO REALIZADO ENTRE SECUENCIAS GENÉTICAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE MUESTRAS DE SUELOS CON EL PROTOCOLO IT-M-212	46
5.2.1 Resultados de identificación genética bacteriana de las muestras de suelo analizadas (tablas 4 a 9).....	48
5.2.2. Cotejo estadístico de las secuencias genéticas procedentes de las muestras de suelo.....	52
5.2.3. Criterios de evaluación.....	54
5.2.4. Tipologías de los resultados obtenidos en el cotejo de las secuencias genéticas	55
5.2.4.1. Tipología I	55
5.2.4.2. Discusión de resultados Tipología I	55
5.2.4.3. Tipología II	55
5.2.4.4. Discusión de resultados obtenidos en Tipología II.....	58
5.2.5. Discusión final de resultados obtenidos en el cotejo realizado	59
6. ESTANDARIZACIÓN INTERNACIONAL DEL ANÁLISIS GENÉTICO BACTERIANO EN SUELOS MEDIANTE METODOLOGÍA T-RFLP. PROYECTO MISAFE	59
6.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA T-RFLP DE MICROORGANISMOS DEL SUELO PARA APLICACIÓN FORENSE	60
6.1.1. Obtención de los t-rflp de adn bacteriano de suelo.....	61
6.1.1.1. Muestras y protocolo empleados.....	61
6.1.1.2. Metodología.....	61
6.1.2. Resultados	62
6.2. VALIDACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PROTOCOLOS DE T-RFLP Y SECUENCIACION GENÉTICA DE MORFOTIPOS PARA APLICACION FORENSE MEDIANTE UN TEST INTERCOMPARATIVO	62
6.2.1. Test intercomparativo: correlacion entre morfotipos de las muestras “Control soil samples S1, S2, S3, SA y SB”.....	63
6.2.1.1. Estudios genéticos de los morfotipos bacterianos en muestras de suelos	63
6.2.1.2. Análisis estadístico de las secuencias de los ADN _r 16S de los distintos morfotipos bacterianos aislados de muestras control de tierra.....	63
6.2.1.3. Resultados del análisis estadístico de los morfotipos (IT-M-212)	63

6.2.1.4. Discusión resultados morfotipos (IT-M-212)	65
6.2.1.5. Test intercomparativo: correlación entre T-RFLP de las muestras de tierra incluyendo los controles “Control samples S1, S2, S3, SA y SB”	65
6.2.1.6. Resultados del análisis estadístico de los T-RFLP obtenidos de los suelos del test intercomparativo.....	65
6.2.1.7. Discusión de los resultados obtenidos a partir T-RFLP de los suelos del test intercomparativo.....	66
6.2.1.8. Discusión final comparativa	66
6.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE ANÁLISIS T-RFLP GENÉTICO BACTERIANO EN MUESTRAS DE TIERRA PROPORCIONADAS POR DIFERENTES LABORATORIOS DEL CONSORCIO FP7-MISAFE	67
6.3.1. Estrategia 1. Muestras de suelos españoles	67
6.3.2. Resultados obtenidos mediante la estrategia 1	75
6.3.3. Discusión resultados estrategia 1.....	75
6.3.4. Estrategia 2. Resultados de los análisis utilizando muestrassuministradas por otros grupos de investigación del consorcio MiSAFE.....	76
6.3.5. Resultados obtenidos mediante la estrategia 2	83
6.3.6. Discusión de resultados obtenidos con la estrategia 2.....	83
6.3.7. Discusión final de resultados obtenidos con estrategias 1 y 2.....	83
CAPÍTULO II. LA PRUEBA PERICIAL MICROBIOLÓGICA EN SUELOS.....	85
1. ASPECTOS ESENCIALES DE LA PRUEBA EN EL SISTEMA PROCESAL ESPAÑOL	86
1.1. LA PRUEBA PERICIAL	87
1.1.1. Propuesta de la prueba pericial.....	88
1.1.2. Pertinencia	88
1.1.3. Peritos, nombramiento y obligación de comparecer	88
1.1.4. Participación de las partes	89
1.1.5. Ejecución de la pericia y el informe pericial.....	89
2. LA PRUEBA PERICIAL MICROBIOLÓGICA EN SUELOS	91
2.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y CADENA DE CUSTODIA	92
2.2. LA PRUEBA PERICIAL MICROBIOLÓGICA DE SUELOS: ESTUDIO Y DERECHO COMPARADO.....	94
2.2.1. La prueba pericial de suelos en España. estudio microbiológico de suelos en el Servicio de Criminalística de la Guardia Civil.....	94
2.2.1.1. Examen preliminar de las muestras de suelo.....	98
2.2.1.2. El análisis de tierra y sedimentos de un molde de huella de zapatos	98
2.2.2. La prueba pericial microbiológica de suelos en derecho comparado.....	98
2.2.2.1. Escena del crimen (Israel)	99
2.2.2.2. Muestras de suelo (Israel).....	99
2.2.2.3. Recomendaciones de procedimiento (Israel).....	99
2.2.2.4. Admisibilidad en juicio de la prueba genético microbiológica(Israel).....	100
2.2.2.5. La prueba pericial microbiológica de suelos en Estados Unidos	100
2.2.2.6. La evolución de los métodos de análisis de suelo (EE.UU).....	101
2.2.2.7. Admisibilidad de las muestras de suelo y credibilidad científica (EE.UU).....	102
2.2.3. Casos penales en España. la prueba pericial microbiológica.....	102
2.2.3.1. STS 300/2013 (Sala 2ª) de 31 de Enero (Secuestro y asesinato)	102
2.2.3.2. SAP de Castellón 104/2010, de 23 de marzo (Robo con violencia y homicidio)	103
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	111
PUBLICACIONES	265

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNmit	ADN mitocondrial
ARN	Ácido Ribonucleico
CE	Constitución Española
CP	Código Penal
FJ	Fundamento Jurídico
JUS	Ministerio Justicia
LECrim	Ley de Enjuiciamiento Criminal
NGS	“New Generation Sequencing” (Secuenciación de nueva generación)
PCR	“ <i>Polimerase Chain Reaction</i> ” (Reacción en cadena de la Polimerasa)
RISA	“ <i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i> ” (Análisis de la región espaciadora intergénica ribosomal)
S (16S, 23S...)	Svedverg. Unidad que mide Coeficiente de sedimentación. Equivale a 10^{-13} segundos.
SAP	Sentencia de la Audiencia Provincial
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido (“ <i>Single Nucleotide polymorphism</i> ”)
STS	Sentencia del Tribunal Supremo
TBNH/NHBT	Trazas Biológicas No Humanas/ <i>Non Human Biological Traces</i>

INTRODUCCIÓN

La presente Tesis realiza un estudio de los aspectos técnicos de los análisis criminalísticos de suelos y, en particular, de una novedosa prueba pericial de reciente aparición en el panorama procesal europeo y español: la prueba pericial microbiológica.

Los principales aspectos que serán desarrollados en esta Tesis son abordados en dos grandes capítulos. El primero de ellos se centra en los trabajos efectuados desde el punto de vista técnico-científico, conducentes a establecer una metodología estandarizada, aplicable y asumida tanto a nivel nacional como internacional, con el fin de reforzar la admisión y validez de esta prueba pericial ante los Tribunales de Justicia. El segundo consistirá en una revisión de generalidades referentes a la prueba pericial microbiológica en el seno del proceso penal.

- I. Revisión científica de las analíticas microbiológicas para su uso como prueba pericial.
- II. Aspectos generales de la prueba pericial microbiológica en suelos.

OBJETIVOS

1. Determinación y tipificación metodológica de los aspectos técnicos y científicos que fundamentan las pruebas periciales genético-microbiológicas.

2. Valoración del uso del suelo y las bacterias que lo habitan como aplicación forense.

3. Revisión al día de la fecha, en el ámbito de los Tribunales de Justicia españoles e internacionales, de la prueba pericial microbiológica.

CAPITULO I

Revisión científica de las analíticas microbiológicas para su uso como prueba pericial

1. INTRODUCCIÓN

Diversos autores reconocen cinco fases evolutivas de la prueba judicial: primitiva (étnica), religiosa, legal, íntima convicción y científica¹. La fase primitiva se caracteriza por la ausencia de un sistema probatorio, consecuencia de un “sistema procesal” rudimentario y con características propias de cada lugar (étnica). El resto de fases se inicia con la caída del Imperio Romano y en ellas podemos encontrar casos de procedimientos judiciales más que cuestionables (Inquisición). Durante el periodo romano Justiniano la valoración de la prueba se basó en un sistema mixto que contemplaba la prueba legal y la apreciación de la misma por el juez. En esta época nace el principio de contradicción y se sientan las bases del Derecho canónico.

Citando a GÓMEZ COLOMER²: “*Es afirmación comúnmente aceptada por la doctrina española la de considerar a la LECrim de 1882 como la última expresión de la evolución legislativa, que transformó al proceso penal inquisitivo del antiguo régimen en el proceso penal **acusatorio formal o mixto**, de origen francés.*”. Como indica TOMÁS Y VALIENTE³: “*El inciso final del artículo 24.2 de la Constitución declara que todos tienen derecho a la presunción de inocencia... Digámoslo con palabras de la muy importante sentencia de la Sala 1ª del Tribunal Constitucional de 28 de julio de 1981: «Una vez consagrada constitucionalmente, la presunción de inocencia ha dejado de ser un principio general del Derecho que ha de informar la actividad judicial (in dubio pro reo) para convertirse en un derecho fundamental que vincula a todos los poderes públicos y que es de aplicación inmediata».*”

DOLZ LAGO⁴ propone diversas perspectivas analíticas desde las que abordar el estudio de la prueba penal, entre las que se encuentran la filosófica-jurídica, la histórica y la técnica.

- a) Respecto a la perspectiva filosófico-jurídica concluye que el conocimiento o epistemología jurídica debe profundizar en la racionalidad de las decisiones judiciales, que comprendería la clasificación de los tipos de enunciados probabilísticos involucrados en la valoración de la prueba, la noción de relevancia y su relación con la admisibilidad y el concepto de *estándar de prueba*⁵.
- b) En cuanto a la dimensión histórica de la prueba penal refiere que el derecho fundamental a la presunción de inocencia, la libertad de aportación de medios de prueba y la libre valoración de la prueba son principios fundamentales de la actual prueba penal, resultado de lentos procesos históricos en contextos revolucionarios, donde la lucha por los derechos humanos ha llevado a los sistemas penales a inclinarse por el modelo acusatorio frente al inquisitivo, en el que la prueba reina era la confesión y el instrumento de obtención de la misma la tortura.
- c) Desde el punto de vista técnico, el análisis de los parámetros científicos y fiabilidad de resultados de la técnica utilizada, así como si es objeto o no de reconocimiento por la comunidad científica o si es sometida, tras dicho reconocimiento, a un proceso de estandarización por laboratorios oficiales, se imponen ya en el estudio de la prueba penal para construir herramientas más eficaces para uso del Tribunal.

¹ DEVIS ECHANDÍA, H. “*Teoría general de la prueba judicial (Tomo I)*”, 3ª edición, Víctor P. de Zabalía, Buenos Aires, 1974, págs. 59 a 66.

² GÓMEZ COLOMER, J.L. “*Introducción al proceso penal español*”. Nuevo Foro Penal. Abril – Junio 1985, pág. 184. https://www.unifr.ch/ddp1/derechopenal/articulos/a_20080521_89.pdf

³ TOMÁS Y VALIENTE, F. “*In dubio pro reo*”, *libre apreciación de la prueba y presunción de inocencia*. Revista Española de Derecho Constitucional. Año 7. Núm. 20. Mayo-Agosto 1987, pág.20.

⁴ DOLZ LAGO, M. J. (Dir.), FIGUEROA NAVARRO, C. (Coord.) *La prueba pericial científica*. Colección de Ciencias Jurídicas y Forenses. Edisofer, Madrid, 2012, págs.22-27

⁵ En DOLZ LAGO, M. J. La prueba pericial científica... Op.cit., pág. 16. El concepto estándar de prueba se refiere a unos criterios, que incluyen las nociones técnicas, dictados por el juez Blackmun, de la Corte Suprema de Estados Unidos, motivado por casos como Daubert vs Merrell Dow Pharmaceuticals, Inc. en 1993, siendo los siguientes: “La controlabilidad y falseabilidad de la teoría científica o la técnica en la que se fundamenta la prueba; el porcentaje de error conocido o potencial, así como el cumplimiento de los estándares correspondientes a la técnica empleada; la publicación en revistas sometidas al control de otros expertos, de la teoría o la técnica en cuestión; la existencia de un consenso general de la comunidad científica interesada”. Cfr. GASCON ABELLAN, Marina en Anales de la Cátedra Francisco Suárez, 44 (2010). Pág.94: “Pero el Daubert test tampoco ha zanjado la polémica sobre el sistema de control de la validez y fiabilidad de las pruebas científicas. Ni mucho menos. Precisamente por dejar también en manos del juez la decisión de si una técnica determinada puede o no ser considerada como científicamente válida, el test ha sido objeto de críticas: primero por la inseguridad jurídica que deriva del hecho de que cada juez pueda decidir según su criterio; y segundo, y sobre todo, porque los criterios sentados por Daubert presuponen en todo caso que el juez es capaz de comprender y manejar conceptos científicos que la mayoría de las veces son complejos, lo que acaso no siempre sea cierto”.

No se debe olvidar a quienes ayudan a que la prueba penal pueda tener consistencia probatoria ante un Tribunal. Los peritos se han convertido en colaboradores imprescindibles del procedimiento penal y, en este sentido, la Ley de Enjuiciamiento Criminal, en los artículos 456 y siguientes de su Título V (capítulo VII), dedicado a la «comprobación del delito y averiguación del delincuente», concede a sus dictámenes la relevancia necesaria y precisa, pues son los especialistas quienes determinan la objetividad de los hechos a través de las diversas y adecuadas técnicas para cumplir tal cometido.

Cuando el nivel de organización delictual progresa dentro de un territorio nacional lo más frecuente es que acabe trascendiendo dicho territorio y, dado que estamos ante un proceso de globalización, la cultura delictual no es menos ajena a este fenómeno, lo cual hace que, en la práctica, para combatirlo los estados hayan de unir fuerzas. La cooperación y el estudio conducente a la estandarización de metodologías influyen en la mejora y calidad de la prueba aportada al proceso penal, de ahí la necesidad de la cooperación internacional entre policías, fiscales y jueces.

Con la aplicación de la Ley Orgánica 10/2007, las bases de datos genético- humanas españolas pasan a combinarse en la Base de Datos Policial Sobre Identificadores Obtenidos a partir del ADN, en la cual participan otras entidades como las policías autonómicas o el Instituto Nacional de Toxicología, una vez han cumplido los requisitos establecidos para ello.

En concordancia con los aspectos, tanto técnicos como jurídicos, que rodean a la alimentación y gestión de las bases de datos genéticas y que trascienden ya a un nivel supranacional, los países miembros de la UE tienen múltiples expectativas en este campo, trabajando activamente en la estandarización de pruebas periciales, tanto en lo relativo al muestreo y técnicas analíticas como en la gestión de bases de datos (no sólo de índole genético-humana). Entre esas expectativas se ha de mencionar el proyecto específico de estandarización de la prueba pericial genético-microbiológica en suelos EU-FP7-MiSAFE⁶ “*The Development and Validation of Microbial Soil Community Analyses for Forensics Purposes*”, del que a continuación exponemos sus objetivos:

1. Desarrollar herramientas adecuadas para el muestreo, almacenaje y procesamiento del DNA de suelos para aplicación en ciencia forense.
2. Aplicar y delimitar el uso de tecnologías basadas en el DNA en la ciencia forense de suelos para investigación y como prueba judicial.
3. Desarrollo y aplicación de software de análisis de datos como herramienta forense de suelos.
4. Validar y consolidar legalmente el uso de la microbiología forense de suelos en los sistemas legales europeos.
5. Proveer de estándares básicos y procedimientos para la creación de una base de datos microbiológica de suelos europea.

Finalmente, como aportación al estudio de la prueba pericial científica desde el punto de vista técnico, esta Tesis expone los trabajos concernientes a la prueba pericial genético-microbiológica realizados por este doctorando y su equipo colaborador en el seno del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil y el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá. Dichos trabajos técnicos se han realizado tanto a nivel nacional como internacional con la finalidad de promover y reforzar su implantación como prueba pericial ante los Tribunales de Justicia de los países miembros de la Unión Europea.

2. LA ACREDITACIÓN BAJO LA NORMA ISO 17025 Y SU INFLUENCIA EN LOS LABORATORIOS OFICIALES

Como explica RODRÍGUEZ⁷, los Laboratorios Oficiales que operan a nivel nacional (en adelante Laboratorios), han regulado internamente, dentro de sus Sistemas de Gestión, aspectos relacionados con la custodia y

⁶ Del que este doctorando ha sido coordinador por España (Guardia Civil), trabajando activamente en todas las fases del proyecto desde su inicio en 2011 hasta su finalización, en junio de 2016. Al respecto indicar que no se prevén inconvenientes legales respecto a la obtención de perfiles genéticos de las comunidades bacterianas.

⁷ RODRIGUEZ JIMENEZ, E. “*La cadena de custodia en los laboratorios oficiales de criminalística y ciencias forenses de España*” en FIGUEROA NAVARRO, C (Dir.) *La cadena de custodia en el proceso penal*. Edisofer, Madrid, 2015, págs.141 y ss.

trazabilidad de las muestras que analizan dentro de sus competencias. Esta regulación responde a la necesidad de estandarización de procedimientos en el mundo criminalístico y forense provocando, como indica el autor, que incluso se regularan actividades que ocurrían fuera de los Laboratorios, sobre todo en el lugar de los hechos, a la vista de que tenían una incidencia considerable en los análisis y estudios que había que realizar a posteriori.

Que un laboratorio oficial esté acreditado mediante la norma UNE-EN-ISO 17.025 en un determinado ensayo o conjunto de ensayos confiere un plus a la hora de ayudar a la autoridad judicial en su libre ponderación de la prueba, pues dicha norma regula criterios estandarizados acerca de la prueba científica que ayudan, como en el caso *Daubert vs Merrell Dow Pharmaceuticals*⁸, a admitir dichas pruebas en el proceso.

2.1. ÁMBITO EXTRACOMUNITARIO

Como indica RODRÍGUEZ⁹, nos encontramos, a nivel internacional, con dos grandes grupos normativos: de carácter general y específico.

2.1.1 De carácter general

Afectan a aspectos técnicos y de gestión en cualquiera de las fases del proceso forense, como puede ser la realización de la inspección ocular.

- La norma ISO 17025:2005¹⁰, sobre “*requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*”, en la que aparecen algunos apartados relacionados con la gestión de vestigios y muestras tales como:
 - ▷ Apartado 5.7 relativo al muestreo, como procedimiento bajo el cual se realiza la toma de una muestra representativa del total de la sustancia, material o producto que luego se analice.
 - ▷ Apartado 5.8 relativo a la manipulación de “ítem” (elemento) de ensayo, en aspectos tales como “*El laboratorio debe tener procedimientos para el transporte, la recepción, la manipulación, la protección, el almacenamiento, la conservación o la disposición final de los ítems de ensayo o calibración, incluidas todas las disposiciones necesarias para proteger la integridad del ítem de ensayo o de calibración, así como los intereses del laboratorio y del cliente*”, o sobre la necesidad de tener “*un sistema para la identificación de los ítems de ensayo que debe conservarse durante la permanencia del ítem en el laboratorio*”.
 - ▷ Apartado 5.10 relativo al informe de resultados (informe pericial), se indica que se debe incluir “*una descripción,... y una identificación no ambigua del o de los ítems ensayados*”, así como su fecha de recepción.

⁸ En DOLZ LAGO, M.J. *La prueba pericial científica... Op.cit.*, pág.16. “La controlabilidad y falseabilidad de la teoría científica o la técnica en la que se fundamenta la prueba; el porcentaje de error conocido o potencial, así como el cumplimiento de los estándares correspondientes a la técnica empleada; la publicación en revistas sometidas al control de otros expertos, de la teoría o la técnica en cuestión; la existencia de un consenso general de la comunidad científica interesada.”

⁹ RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, E. “*La cadena de custodia...Op.cit.*, págs.141 y ss.

¹⁰ La Norma **UNE-EN ISO/IEC 17025:2005** establece los requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración que ENAC utiliza como criterios para la acreditación. Por requisitos de la normativa, los laboratorios han sentido la necesidad de implementar un Sistema de Calidad que asegure la confiabilidad de sus resultados. La Norma ISO IEC 17025 sustituye a las anteriores Guía PISO IEC 25 (General requirements for the competence of calibration and testing laboratories) y a la norma europea EN 45001 (Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo [UNE, 1991]) aportando nuevos requisitos en los aspectos de las responsabilidades y compromiso de la alta dirección y poniendo mayor énfasis en la mejora continua según el método PDCA y la interlocución con el cliente.

Se publicó en España en julio de 2000 como la UNE-EN ISO/IEC 17025 siendo una traducción de la norma europea [UNE, 2000], de la cual se desprenden los criterios para la certificación de los laboratorios, establecidos por la entidad Nacional de Acreditación ENAC. Es una normativa internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración. Se trata de una norma de Calidad, la cual tiene su base en la serie de normas de Calidad ISO 9000. Aunque esta norma tiene muchos aspectos en común con la norma ISO 9001, se distingue de la anterior en que aporta como principal objetivo la acreditación de la competencia de las entidades de Ensayo y calibración, por las entidades regionales correspondientes. Esta norma es aplicada por los laboratorios de ensayo y calibración con el **objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y de que son capaces de producir resultados técnicamente válidos.**

- Norma ISO 17020:2012¹¹ sobre “*evaluación de la conformidad, requisitos para el funcionamiento de los diferentes tipos de organismos que realizan la inspección*” en la que aparecen algunas referencias relacionadas con la gestión de vestigios y muestras tales como:
 - ▷ Apartado 7.2 sobre tratamiento de los ítems de inspección y de muestras, donde se indica que “*debe asegurarse de que los ítems y muestras a inspeccionar poseen una identificación única con el fin de evitar toda confusión respecto a su identidad*”.
 - ▷ Anexo B, sobre elementos opcionales de los informes, en el que se indica que cuando corresponda se deberá incluir “*información sobre dónde, cuándo, cómo y por quién fueron tomadas las muestras*”.
- ILAC G-19: 2002 , sobre “*directrices para los laboratorios forenses*”, en la que se indican algunas aclaraciones para la implantación de la norma ISO 17025 en este tipo de ensayos, en la que se incluye por ejemplo, un apartado 5.8 sobre manipulación de objetos de ensayo y calibración, en el que se cita literalmente:

“A efectos legales, los laboratorios de ciencia forense deberán ser capaces de demostrar que los objetos/muestras examinados y sobre los que se ha realizado un informe son los mismos que se enviaron al laboratorio. Se deberá llevar un registro de la “cadena de custodia” desde el recibo de los objetos/muestras que indique con detalle cada persona que toma posesión de un objeto o alternatively la localización de ese objeto (por ej. si se encuentra almacenado).”

Trabajar conforme a estas normas de calidad conlleva ventajas relacionadas con el estándar de la prueba, tales como: el reconocimiento de la validez de los resultados, de la competencia técnica para realizar esas tareas o ensayos, el facilitar la cooperación entre los laboratorios, el ayudar a la armonización de normas y procedimientos y el intercambio de información y experiencia.

Como consecuencia, instituciones como la Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses (ENFSI, *European Network of Forensic Science Institutes*), exige a sus laboratorios miembros estar acreditados, e incluso, ir aumentando el alcance de sus acreditaciones hasta cubrir, al menos, el 50% de los ensayos que realizan.

2.1.2. De carácter específico¹²

Afectan a aspectos técnicos y de gestión directamente relacionados con aspectos concretos de un campo de trabajo de las ciencias forenses. Algunos ejemplos de este tipo de normativa, en lo que afecta a la gestión de los vestigios y muestras son:

- Norma ISO 27037:2012: sobre “*Tecnología de la información — Técnicas de seguridad — directrices para la identificación, toma, adquisición y preservación de evidencias digitales*” que proporciona orientaciones sobre mejores prácticas en la citada gestión de evidencias digitales potenciales que permitan aprovechar su valor probatorio. Se orienta a su uso en investigaciones forenses digitales, destinadas al esclarecimiento de hechos en los que interviene de alguna forma un recurso electrónico o digital.
- Directrices específicas para determinados campos de trabajo, como por ejemplo las “*Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética*” (ADN humano) elaborado por el Grupo de habla español y portugués de la ISFG (GHEP-ISFGH). 02/06/2000.

2.2. ÁMBITO UNIÓN EUROPEA

El Consejo de la Unión Europea ha elaborado un conjunto de conclusiones sobre la visión de las Ciencias Forenses en Europa para el año 2020, con el objetivo de crear un área forense europea y el desarrollo de las ciencias forenses y de la infraestructura necesaria para dicha área. Se instó, dentro de las propias Conclusiones del Consejo, a la participación tanto de los estados miembros como de organizaciones especializadas como la Red europea ENFSI, a través de la elaboración de planes de acción específicos en unos ámbitos determinados, siendo uno de estos la definición de requisitos mínimos de calidad en la investigación del lugar de los hechos y la gestión de vestigios, desde la escena del delito a la presentación de la prueba pericial ante los tribunales.

¹¹ Esta norma es de susceptible aplicación a los equipos policiales que realizan inspecciones oculares.

¹² RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, E. *La cadena de custodia...* Op. Cit., págs.141 y ss.

Los Laboratorios tienen como referente su pertenencia a la Red europea ENFSI, dentro de la cual cabe destacar los siguientes preceptos:

- Para poder pertenecer a la Red, se exigió desde 1999 la implantación de un sistema de calidad cumpliendo los requisitos de la norma EN 45001 (anterior a la 17025). Actualmente se exige la Acreditación del laboratorio para poder pertenecer a la Red.
- Existencia de Grupos de Trabajo de Expertos de cada una de la áreas forenses (ADN, balística, Gráfica, informática, etc.) en los que se han elaborado manuales de buenas prácticas¹³, que recogen una serie de recomendaciones sobre cómo actuar en la escena del crimen para garantizar la trazabilidad y preservación de los vestigios/muestras.

Además ENFSI ha colaborado en la elaboración de documentos aclaratorios con otros organismos europeos, como la Entidad Europea de Acreditación (EA), en concreto del documento EA-5/3 sobre “*directrices para la implantación de la ISO/IEC 17020 en el campo de la investigación de la escena del crimen*”, que ha ayudado a la interpretación y aplicación de la norma ISO 17020 para la realización de la inspección ocular en la escena del crimen.

ENFSI es reconocida por el Consejo de Europa como una plataforma de intercambio eficaz de conocimientos entre los laboratorios forenses, de establecimiento de requisitos mínimos de calidad y de colaboración internacional, capaz de identificar las necesidades de la comunidad forense¹⁴. En este ámbito, los Laboratorios, se verán afectados en un futuro próximo por la aparición de una nueva norma europea sobre manipulación y control de vestigios/muestras en la escena del crimen, o por la revisión o elaboración de los Manuales de Buenas Prácticas de los 17 Grupos de Trabajo de ENFSI, que han finalizado en 2015. Respecto al campo de la genética no humana y su aplicación en el ámbito forense, se ha confeccionado un documento marco¹⁵ que sienta las bases futuras de trabajo a nivel internacional y que incluye directrices concernientes a la prueba pericial genético-microbiológica, las cuales se extractan a continuación.

2.2.1. Manual de Buenas Prácticas para la Aplicación de Métodos Moleculares para el examen forense de restos biológicos no humanos (ANEXO G)

El objetivo de este Manual de Buenas Prácticas (MBP) es proporcionar un marco de procedimientos, principios de calidad, procesos de entrenamiento y enfoques para el estudio forense. Este MBP puede ser utilizado por los laboratorios miembros de ENFSI y otros laboratorios de ciencias forenses para el establecimiento y mantenimiento de prácticas de trabajo en el campo de la genética molecular forense de trazas biológicas no-humanas (TBNH/NHBT) que proporcionen resultados fiables, maximizando la calidad de la información obtenida y proporcionando pruebas robustas. El uso de una metodología coherente y la producción de resultados más comparables facilitarán el intercambio de datos entre laboratorios.

La diversidad en el tipo de vestigios en este campo, la enorme variabilidad de las dinámicas poblacionales y genéticas de estos indicios, así como el desarrollo de nuevas herramientas y técnicas moleculares (ADN/ARN), hace deseable la formulación de buenas prácticas. El término MBP se usa para reflejar las prácticas científicamente aceptadas en el momento de su creación. A pesar de la sugerencia implícita a que los equivalentes o alternativos Manuales de Prácticas están excluidos de antemano, en estas series de Manuales de Prácticas de ENFSI el término MBP se mantiene por razones de continuidad y reconocimiento.

¹³ La que aplica a la genética no humana: BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTILLANA, E.J.; STAGINNUS, C. “*Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for Forensic Examination of Non Human Biological Traces*”. ENFSI-BPM-APS-01. Versión 1. Noviembre 2015. Publicado 08/06/2016 <http://www.enfsi.eu/documents/best-practice-manuals>.

¹⁴ RODRIGUEZ JIMENEZ, E. *La cadena de custodia... Op.cit.*, págs.141 y ss. Las Conclusiones del Consejo de Europa invitaban a la participación de ENFSI para el desarrollo de un plan de acción detallado que permita la implantación de la visión de la Ciencia Forense Europea 2020. Además, se apuntó la necesidad de que se desarrollaran normas forenses en Europa. De ahí que el 24 de mayo de 2012, el Comité Europeo de Normalización (CEN) aprobara la creación de un nuevo Comité técnico, el TC 419: de servicios forenses. CEN ha aceptado la participación activa de ENFSI en el TC 419 para elaborar cuatro normas europeas (EN) que abarcarán: la escena del crimen, el análisis en el laboratorio, la interpretación de resultados y la defensa del informe pericial en juicio oral.

¹⁵ BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTILLANA, E.J.; STAGINNUS, C... “*Best Practice Manual... Op.cit.*”, págs. 20 y 21.

Se proporcionarán algunas recomendaciones para la interpretación de resultados analíticos y la expresión del valor criminalístico. Estas recomendaciones serán de aplicación a TBNH/NHBT cubriendo las ventajas y desventajas de su uso en casuística forense.

Debe enfatizarse que este manual está hecho para estimular un enfoque sistemático y de alta calidad forense, sin limitar el uso de herramientas novedosas en ADN/ARN o indicios forenses poco comunes. Para este propósito el manual proporciona unos requerimientos mínimos más que unas buenas prácticas para una validación y aplicación efectiva. Estas recomendaciones se dan para armonizar metodologías entre laboratorios forenses, permitir el intercambio de información, conocimientos y bases de datos.

Alcance

Este MBP está dirigido a expertos en la materia y supone un conocimiento previo de la disciplina. No se trata de un procedimiento operativo estándar, solamente pone de manifiesto los requerimientos del sistema judicial en términos generales.

Esto sirve como marco de requisitos mínimos y recomendaciones para el análisis genético molecular de TBNH/NHBT en casuística forense. La casuística forense comienza en la escena del crimen donde la recogida y aseguramiento de los indicios debe realizarse de forma metódica para garantizar que puedan ser empleados tantos métodos analíticos como sea posible. El siguiente paso en el proceso consiste en el examen y descripción de los indicios para la formulación del plan de análisis. El plan analítico depende de la cuestión forense, tecnologías disponibles, preservación de los indicios y evidencias y el valor criminalístico de los resultados analíticos.

Este marco incluye la protección de TBNH/NHBT en la escena del delito y de las partes de la evidencia, su estudio y posterior análisis usando herramientas moleculares, interpretación de datos y elaboración de un informe forense. Aunque son aplicables métodos y herramientas adicionales como los análisis de inmunología e isótopos, no son objeto de este manual.

A diferencia de la investigación de indicios de ADN humano, no hay restricciones en lo que concierne a loci de ADN y privacidad de la información genética de animales, plantas y microorganismos. Se puede aplicar un amplio rango de tecnologías debido al amplio espectro en el que se encuentra la información genética (ADN, ARN) y su organización (e.g. herencia, estrategias reproductivas, etc.).

Cuando se recomienda el empleo de marcadores de ADN o ARN, solo es para facilitar el intercambio de datos y armonización de métodos y bases de datos, sin asignar mayor valor a unos marcadores o devaluando otros que tengan los mismos requerimientos mínimos. Las herramientas tales como los marcadores de ADN/ARN pueden ser altamente variables entre diferentes poblaciones y se están desarrollando nuevas herramientas de forma regular...Para ciertos tipos de especies y trazas biológicas se proporcionan recomendaciones para la interpretación de los resultados para resaltar las limitaciones y restricciones.

Métodos

Las muestras forenses no humanas –en contraste con las humanas– requieren el desarrollo de nuevos marcadores específicos para cada nuevo grupo de organismos investigado, ya que la mayoría de los marcadores son altamente específicos y solamente funcionan en un limitado conjunto de especies relacionadas. Las diferentes estrategias reproductivas de los organismos también pueden jugar un papel importante en cómo los métodos de ADN/ARN se pueden aplicar al tipado taxonómico, tipado químico, individualización o asignación geográfica/genealógica de las NHBT.

Determinación de la composición de una población de microorganismos: análisis microbiano.

La composición de los taxones representados en una comunidad de microorganismos permite asignar una muestra a un ambiente del que procede, si es estable y distintivo. Debido a la amplia diversidad microbiana y la influencia de varios factores bióticos y abióticos, la dependencia de la procedencia de los perfiles de ADN microbiano puede emplearse para determinar el origen no humano del material encontrado en el cuerpo humano, por ejemplo en la piel o el sistema digestivo, o el origen de trazas de suelo.

Está disponible la extracción directa de ADN y posteriores técnicas basadas en la PCR de estas poblaciones bacterianas, por lo que la diversidad microbiana puede visualizarse sin la pérdida de especies no cultivables.

La visualización de especies más y menos abundantes en la comunidad hace que este método sea muy sensible a los valores de corte y efectos de dilución.

El método de extracción es importante, ya que algunas bacterias (ej. Gram positivas) y esporas son difíciles de lisar, o están contenidas en una matriz rígida como suelos compactados. Los métodos con agresivos pasos de lisis, por ejemplo agitación mecánica, son muy apropiados para la extracción de ADN de células difíciles de lisar o aquellas con matrices rígidas. La elección de un método de extracción puede influir en el perfil final de ADN de la población microbiana.

Para la mayoría de los análisis posteriores, la cantidad de ADN a introducir necesita ser cuantificada por diferentes matrices, dando un amplio rango de concentraciones de ADN bacteriano lo que puede influir en el perfil final de ADN. Ciertos suelos o muestras fecales pueden contener una gran cantidad de ADN bacteriano. El gen 16S rRNA (bacterias) o los genes 18S/23S rRNA (hongos) pueden usarse como loci diana para la caracterización de la comunidad. Para mayor diferenciación dentro de las enterobacterias fecales puede usarse el gen GroEL.

El enfoque puede involucrar también vegetales y metazoos como diana para estudiar un espectro más amplio de seres vivos¹⁶. Seguido a la PCR, los métodos para visualizar las poblaciones típicamente incluyen técnicas de digestión, por ejemplo, los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción terminal (T-RFLP, RISA¹⁷), las técnicas de hibridación como análisis de “microarray” (chip de ADN) o ensayos de secuenciación masiva en paralelo (NGS). Todas estas técnicas tienen diferentes resoluciones y es importante elegir la(s) técnica(s) con la resolución deseada.

- Con T-RFLP/RISA no se genera información taxonómica sobre los microorganismos presentes. Sin embargo, estas técnicas son útiles para comparar muestras para determinar el posible origen común. La reacción de PCR se puede realizar con uno o dos “primers” marcados (dependiendo de las regiones amplificadas un primer marcado puede ser suficiente). La elección de la combinación de cebadores y enzimas de restricción determina cuántos fragmentos de restricción pueden generarse.
- Con análisis de ADN mediante chips la información taxonómica se hace disponible. Para algunas aplicaciones hay disponibles chips de ADN comerciales, aunque también resultan adecuados los diseñados por el laboratorio. Las sondas de ADNr 16S se pueden validar frente a bases de datos públicas o privadas.
- La secuenciación de nueva generación (NGS) puede dar una idea de la población a una resolución muy elevada. La secuenciación de amplicones de genes del ARNr 16S puede emplearse para la determinación taxonómica al menos hasta la categoría taxonómica de género, mientras que la secuenciación “shotgun” (fragmentación aleatoria) puede llevar a una categoría inferior de determinación taxonómica. La longitud deseable de la secuencia leída depende de la aplicación que para cada NGS se utilice. Para la identificación de especies, lecturas de secuencias más largas puede dar más información. Una resolución extremadamente alta obtenida mediante técnicas NGS puede no ser siempre necesaria para investigaciones/estudios forenses.

3. NECESIDAD DE VALIDACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS MEDIANTE LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025:2005

Se ha comentado que la norma ISO/IEC 17025:2005 aporta como principal objetivo la acreditación de la competencia de las entidades de Ensayo y calibración, por las entidades nacionales correspondientes. Esta norma es aplicada por los laboratorios de ensayo y calibración con el **objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y de que son capaces de producir resultados técnicamente válidos**.

¹⁶ GIAMPAOLI S., BERTI A., DI MAGGIO R.M., PILLI E., VALENTINI A., VALERIANI F., GIANFRANCESCHI G., BARNI F., RIPANI L., ROMANO SPICA V. “The environmental biological signature; NGS profiling for forensic comparison of soils”. Forensic Science International 240, 2014, págs. 41 a 47.

¹⁷ Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (Análisis de la región espaciadora intergénica ribosomal). En esta técnica, la parte amplificada del ADN no es la que codifica la subunidad 16S del ribosoma, sino la parte (ISR-Región espaciadora intergénica) que está entre los genes que codifican para esa subunidad y la subunidad 23S. Este análisis proporciona información de la diversidad y composición de una comunidad microbiana.

Esa competencia técnica bajo el amparo de la citada norma es el marco de estandarización que la comunidad criminalístico-forense internacional ha considerado adecuada para la ejecución de pericias que tengan que ser defendidas ante los Tribunales de Justicia. Cada vez más los jueces requieren el apoyo de pericias efectuadas por Laboratorios oficiales acreditados por dicha norma. Para conseguir la acreditación, lo cual afecta también a la pericial genética microbiológica, todos los procedimientos en el ámbito de la norma ISO 17025 han de ser validados. La validación de un método de ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos, y establece los límites de cada técnica y su campo de aplicación.

3.1. CONTROLES DE CALIDAD. MARCADORES MOLECULARES (REVISIÓN GENERAL)

Los laboratorios se someten periódicamente a ejercicios de intercomparación entre laboratorios, tanto nacionales como internacionales, y a controles internos que abarcan a todos los procesos (requisito de la norma ISO 17025)¹⁸.

Los **marcadores moleculares**¹⁹ son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un **QTL** (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular **monomórfico** es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es **polimórfico**. A veces el grado de variación es tal que se denominan **hipervariables**. Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e **isoenzimas** por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los **marcadores moleculares basados en el DNA**, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades. El número de técnicas descritas es cada vez más numeroso, por lo que vamos a reunir las en 3 categorías: **RFLP**, **MAAP** y **STS**.

3.1.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)

Esta técnica, desarrollada a finales de los 70, se basa en la detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los “pequeños” derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que delecciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En cambio, para moléculas de DNA de mayor tamaño, como el DNA cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de “Southern Blot”. Aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la fre-

¹⁸ La norma **UNE-EN ISO/IEC 17025:2005** en su apartado 5.4.2 establece que “El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo y calibración que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto. Se deben utilizar preferentemente los métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales.” Además, la norma establece que el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante del equipo. También indica la norma que se pueden utilizar métodos totalmente desarrollados por el laboratorio o adaptados por éste basados en métodos normalizados, siempre y cuando sean apropiados para el uso previsto y hayan sido validados.

¹⁹ Cfr. CLAROS DÍAZ, M. G. (Universidad de Málaga) disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

cuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP.

3.1.2. MAAP (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación)

Término genérico acuñado en 1994 con el que se designan las técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios para generar huellas dactilares complejas. Entre estas técnicas merecen destacarse:

- **RAPD** (DNA polimórfico amplificado al azar): Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36°C) aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de DNA. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán una huella dactilar característica. Es muy cómoda, rápida, requiere poco DNA, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos. Sus inconvenientes son que los fragmentos amplificados no suelen corresponder a DNA ligado a algún carácter, sino redundante, y que no da información sobre el número de copias que el DNA genómico contiene de la secuencia amplificada. Esta tecnología ha sido utilizada para la catalogación de frutos, selección de variedades, y diferenciación de líneas clonales.
- **AP-PCR** (*PCR con oligonucleótidos arbitrarios*): La idea es similar a la de la RAPD, desarrollándose a la vez que ésta, aunque se cambia el diseño de los oligonucleótidos y el tipo de PCR. Los oligonucleótidos han de ser largos (no menos de 20 nucleótidos), y la PCR consta de dos de ciclos poco específicos que permiten la polimerización de una batería de fragmentos característicos de cada variedad. Esta fase va seguida de ciclos de alta astringencia (especificidad) para amplificar (visualizar) específicamente las bandas anteriores. Existe una variación denominada **DAF** (Huellas dactilares por amplificación de DNA) que utiliza oligonucleótidos de 5 a 15 bases, pero las huellas proporcionadas suelen ser muy complejas y difíciles de interpretar.
- **AFLP** (*Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados*): Esta técnica se desarrolló en 1995 y combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El DNA se corta con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente, y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas y se amplifican por PCR. Jugando con la complementariedad del oligonucleótido con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. Una ventaja especial de esta técnica es que es capaz de generar muchos marcadores moleculares en una sola reacción.

3.1.3. STS (Sitios etiquetados por la secuencia) o SSLP (Polimorfismo de longitud en las secuencias discretas)

Desarrollada a partir de 1989, aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente. Por tanto se combinan la rapidez de la RAPD con la especificidad de la RFLP. Por la manera en que se determinan los oligonucleótidos y por la forma de analizar los polimorfismos, esta técnica ha derivado en otras que enumeramos a continuación:

- **SSR** (*Repetición de secuencias discretas*), descrita en 1989. En los genomas existe un DNA ubicuo y abundante denominado “microsatélite” que consiste en mono-, di-, tri-, tetra- y hexanucleótidos repetidos en tándem. Este DNA, que es muy polimórfico, se ha utilizado como marcador molecular cuando la secuencia del motivo repetido se clona y secuencia para usarla en el análisis de poblaciones. De esta manera se han estudiado con éxito numerosos árboles, aunque en algunos se ha visto que los microsatélites son menos variables de lo que se esperaba. Otras siglas para designar esta técnica son ISSR, IMA,

ISA, IRA, y RAMP. Los STRs²⁰ (“*Short Tandem Repeats*”) y SNPs (“*Single Nucleotide Polimorphisms*”) entran en esta categoría.

- **EST** (*Sitios etiquetados por la expresión*), descrita en 1991. Su particularidad proviene del hecho que los oligonucleótidos se han deducido a partir de cDNA parcial o completamente secuenciado. Curiosamente el polimorfismo sólo se observa claramente cuando los fragmentos amplificados se cortan con enzimas de restricción, lo que hace que el método sea realmente costoso en tiempo y dinero.
- **CAPS** (*Secuencia polimórfica amplificada y cortada*), descrita en 1993. Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y se migra en un gel de agarosa. Las variaciones se detectan por presencia o ausencia de sitios de restricción. Se pueden así localizar cambios finos en una zona específica.
- **SCAR** (*Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas*), descrita en 1993. Esta técnica aprovecha que las RAPD proporcionan principalmente fragmentos de DNA altamente repetido. Estos fragmentos de RAPD se clonan y secuencian para elaborar oligonucleótidos específicos. Aunque permite el desarrollo rápido de marcadores moleculares, el grado de polimorfismo obtenido es bastante bajo.
- **SSCP** (*Polimorfismo de conformaciones monocatenarias*), descrita en 1989. Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA monocatenario. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de DNA de gran tamaño (en general superior a 150 kpb) o bien bandas de tamaño muy próximo. Puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos en una secuencia de más de 1 kpb.

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, y dispersión de especies.

3.2. REGISTROS Y TRAZABILIDAD DE LAS OPERACIONES REALIZADAS

Todos los pasos de la analítica, desde que se inician los estudios de las muestras hasta la emisión de la correspondiente comunicación o informe, quedan registrados de modo que se pueda conocer toda la información referida a cada muestra, relativos a personal, reactivos empleados en la analítica, equipos, fecha de cada fase del procedimiento, etc.

Estos registros se realizan en soporte informático y/o papel. Por otra parte, para la gestión de los datos referentes a los ensayos, tales como procedencia, muestras que comprende cada asunto, especialista que se hace cargo del mismo, resultados obtenidos y cotejo en base de datos, los Laboratorios han de contar con un sistema informático de gestión.

3.3. CONCLUSIONES DE LOS ENSAYOS Y MÁRGENES DE FIABILIDAD (SEGÚN NORMA ISO 17025)

Las conclusiones expresadas en los informes emitidos a partir de los resultados obtenidos, como norma general, se expresan acompañadas de una valoración estadística que evalúa las probabilidades de encontrar, por ejemplo, el mismo perfil en la población estudiada, índices de probabilidad o verosimilitud, o índices de paternidad si es el caso.

²⁰ Secuencias de ADN formadas por la repetición en tándem de unidades de entre 2 y 4 nucleótidos (habitualmente, aunque también de seis) flanqueado por dos regiones altamente conservadas y sin variación de secuencia. Los marcadores microsatélites son los marcadores moleculares más ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones debido a su alto polimorfismo, codominancia y abundancia a través del genoma. Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del fragmento repetido. Su variabilidad es debida a que cada alelo tiene un número diferente de repeticiones de estas unidades, de forma que un locus microsatélite típico, presenta un número elevado de alelos, lo que le convierte en un marcador con un alto grado de polimorfismo.

Para elaborar los cálculos estadísticos se utilizan datos poblacionales procedentes de la comunidad científica, que cumplen con los requerimientos bioestadísticos necesarios, por lo que dichos cálculos son también objetivos y reproducibles.

Valorar la prueba científica consiste en determinar lo que hay que creer a partir de las conclusiones del informe pericial. Consiste, en otras palabras, en atribuir a las conclusiones del informe un peso en la formación de su convicción sobre las hipótesis de las partes²¹. Esta valoración debe hacerse tomando en consideración los datos estadísticos aportados en el informe pericial y ponderándolos con el resto de las pruebas e informaciones obrantes en la causa. El juez realiza normalmente esta valoración sin auxilio alguno de las matemáticas, sin embargo, la valoración de la prueba científica también puede realizarse recurriendo a instrumentos matemáticos.

La fórmula que permite poner en relación el valor estadístico de una prueba científica con el valor atribuido anteriormente por las otras pruebas e informaciones obrantes en la causa al enunciado fáctico que se pretende probar es el Teorema de Bayes, que en su formulación más simple afirma que la probabilidad de un evento H, dado un evento E, puede determinarse en función de la frecuencia estadística con la que dado H se verifica E y de la probabilidad atribuida precedentemente al evento H.

$$P(H/E) = \frac{P(E/H)}{P(E/\text{no-H})} \cdot P(H)$$

En general la exclusión de un individuo es categórica, mientras que la inclusión tiene unos márgenes de fiabilidad. En lo referente a dichos márgenes, se presentan los siguientes casos:

P(H/E): probabilidad de H, dado un evento E (*posterior probability*).

P(E/H): frecuencia estadística con la que, dado H, se da E.

P(E/no-H): frecuencia estadística con la que, sin darse H, se da E.

P(E/H) / P(E/no-H) (*Likelihood ratio* de E respecto de H, que mide la mayor o menor probabilidad con que E será verdadera siendo H verdadera que sin serlo).

P(H): probabilidad atribuida a H antes de saber si E se daba (*prior probability assessments*).

3.4. RECOMENDACIONES ENFSI SOBRE GENÉTICA NO HUMANA

Las recomendaciones de ENFSI hacia la estandarización de las pruebas periciales consistentes en el empleo de técnicas analíticas en el ámbito de la genética no humana comienzan en el **reconocimiento de dicha comunidad científica forense y criminalística de que la norma ISO 17025 es una garantía para definir progresivamente un marco adecuado y garante de buenas prácticas de laboratorio**. En ese sentido los expertos europeos en genética no humana de ENFSI han trabajado en dicha estandarización. A continuación citaremos las recomendaciones emitidas por el Grupo de trabajo ENFSI-APST (Animales, plantas y trazas biológicas en suelo) en 2016²².

3.4.1. Recomendaciones generales (ENFSI-APST)

3.4.1.1. Validación

Las técnicas aplicadas en las investigaciones forenses requieren de validación preliminar acorde a los estándares forenses, como son las recomendaciones de la Sociedad internacional de genética forense (ISFG). El

²¹ GASCON ABELLAN, M. “Prueba científica, mitos y paradigmas” en Anales de la Cátedra Francisco Suárez, nº 44, 2010, pág.101. Al respecto y, para profundizar en la materia: LUCENA, J.J.; ESCOLA, M.A. y PARDO, V. “Elementos para el debate sobre la valoración de la prueba científica en España: hacia un estándar acreditable bajo la norma ISO 17.025 sobre conclusiones de informes periciales.” Revista Internacional de Estudios de Derecho Procesal y Arbitraje, nº2, septiembre 2011. Disponible: http://www.academia.edu/1184026/JOS%C3%89_JUAN_LUCENA_MOLINA_MIGUEL_%C3%81NGEL_ESCOLA_GARC%C3%8DA_Y_VIRGINIA_PARDO_IRANZO_Elementos_para_el_debate_sobre_la_valoraci%C3%B3n_de_la_prueba_cient%C3%ADfica_en_Espa%C3%B1a_hacia_un_est%C3%A1ndar_acreditable_bajo_la_norma_ISO_17.025_sobre_conclusiones_de_informes_periciales_

²² BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTILLANA, E.J.; STAGINNUS, C. “Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for Forensic Examination of Non Human Biological Traces”. Op.cit ... <http://www.enfsi.eu/documents/best-practice-manuals>.

método de validación depende de la técnica específica y de su aplicación²³. La aplicación de nuevos marcadores requiere una clarificación preliminar o determinación de su fondo genético. La genética específica del organismo estudiado puede requerir diferentes formas de validación. Generalmente, la validación puede ser dividida en validación biológica (de marcadores de especies, sistemas de STRs o SNPs, incluyendo su interpretación), validación técnica de métodos analíticos utilizando un equipamiento dedicado y validado de la interpretación.

3.4.1.2. Validación biológica

Con respecto a la validación de marcadores de ADN para ciertos propósitos (identificación taxonómica, “individualización” dentro de especies, análisis parental), deben ser evaluados los parámetros biológicos conocidos:

- Origen genético del marcador de ADN

El origen genético de un marcador de ADN podrá influir en la herencia, como se discutirá en el próximo párrafo. Sin embargo, como indican los expertos forenses²⁴ si el origen genético es un locus de múltiples copias, se pueden producir heteroplasmas de longitud y nucleotídicas. Además, copias de las secuencias de ADNmt pueden estar presentes en el genoma nuclear. Estos hechos pueden encontrarse durante la validación y pueden variar entre individuos, especies y poblaciones, sin afectar la aplicabilidad del marcador de ADN. Sin embargo, debería documentarse si estos tipos de variación podrían ser esperados y las consecuencias resultantes.

- Variación biológica (dentro de una muestra individual, entre individuos dentro de especies, entre especies, entre poblaciones)

Con el fin de evaluar la aplicabilidad de un marcador para la identificación de especies, individualización o compatibilidad genealógica, es importante documentar el comportamiento del marcador dentro de la población relevante. Los marcadores para la identificación de especies deberían ser testados para la variación intra-especies y la variación inter-especies (para especificar diferencias con las especies emparentadas más próximas).

Para la validación biológica de marcadores de ADN, las recomendaciones incluyen la selección del marcador apropiado, secuencias de primer, estudios intra e inter especies para tipado taxonómico y especificidad de “*primers*”²⁵ (*cebadores*) y reproducibilidad, probabilidades de mutación para alelos de STRs, frecuencias alélicas y factores de parentesco para análisis de identidad. Cuando se realiza de forma rutinaria el análisis de ADN y/o se requieren comparaciones interlaboratorios, se pueden utilizar las recomendaciones relativas a la utilización de repeticiones tetraméricas y “*ladder*”²⁶ alélicos.

3.4.1.3. Validación técnica

La validación técnica se refiere a la optimización y estandarización de una técnica analítica con los reactivos, equipamiento y controles elegidos. Para la validación técnica, se pueden encontrar varios criterios y recomendaciones. Se debe reconocer que algunos criterios y recomendaciones están escritos para métodos cuantitativos²⁷. Desde que el análisis de ADN también puede ser sólo cualitativo, especialmente cuando está implicada la “*end-point*” PCR, así como para muchos de los análisis de STRs, análisis de paternidad e identificación de taxones, algunos de los parámetros de validación particulares a métodos cuantitativos no son aplicables.

²³ LINACRE A., GUSMAO L., HECHT W., HELLMANN A.P., MAYR W., PARSON W., PRINZ M., SCHNEIDER P., MORLING N. ISFG: “*Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations*”. FSI Genetics 5 , 2011, págs. 501 a 505.

²⁴ BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTI-LLANA, E.J.; STAGINNUS, C. “*Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for Forensic Examination of Non Human Biological Traces*”... *Op.cit.* <http://www.enfsi.eu/documents/best-practice-manuals>.

²⁵ Cadena de nucleótidos con el extremo 3'-OH libre que sirve como iniciador de la reacción de polimerización de la cadena de ADN con una secuencia complementaria a las regiones que flanquean el fragmento repetido (marcador- microsatélite).

²⁶ Patrón artificial de polimorfismos alélicos en un locus.

²⁷ QCC-VAL-002, Guidelines for the single laboratory Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science, version 001, 10/11/2014.

3.4.1.4. Validación de la interpretación

Para la identificación de especies, la evaluación de marcadores específicos, denominación de las bases y/o la comparación de las secuencias debe ser validado.

Para el análisis de STRs, debería validarse la identificación de alelos, comparación de perfiles, evaluación de alelos nulos, ganancia alélica, pérdida alélica y la producción de “stutters” o artefactos²⁸. Para la interpretación del tipado de ADNmt, se han realizado guías y deberían ser validadas para la aplicación a TBNH²⁹.

Los eventos de mutación pueden producirse en la generación seleccionada para el análisis, que puede producir inconsistencias en un número limitado de loci, mientras que otros loci muestran consistencia genética: además no cada falso alelo indica falso parentesco, sino que se debe a eventos (raros) de mutación.

Las tasas de mutación en locus y marcadores específicos deberían ser evaluados por estudios de cribados de familias: estos deberían entonces ser incorporados al análisis de parentesco. Sin embargo, frecuentemente esto no es posible para especies salvajes o raras, por lo que además la interpretación del perfil debería ser cuidadosa.

Si las tasas de mutación no están disponibles, una estimación conservadora de 10^{-3} mutaciones por generación se ha sugerido para marcadores de tipo STR y las diferencias en más de dos *loci* por cada 10-12 marcadores de tipo STR como umbral para la exclusión parental³⁰.

En general, se puede afirmar que cuando los análisis son aplicados en un único caso en indicios que aparecen rara vez, tanto los “*ladders*” alélicos como la nomenclatura estandarizada no siempre son necesarias. Si los resultados tienen que ser comparados con otros laboratorios o estudios previos en bases de datos, estas herramientas son altamente recomendables.

3.4.1.5. Estimación de la incertidumbre de medida

Cuando se aplica PCR cuantitativa, la desviación estándar de los valores CT deberían estar determinados, traducidos a la actual desviación en la concentración de ADN y reportados. Para métodos cualitativos, la estimación de la incertidumbre de la medida es una parte integral de la validación del proceso de interpretación. Posibles fuentes de incertidumbre son la preparación de la muestra, la extracción de ADN, purificación, amplificación, detección e interpretación.

3.4.1.6. Evaluación de los datos

El método de evaluación debe ser el apropiado para el análisis aplicado. Los resultados han de ser obtenidos de forma no ambigua de la secuencia y/o longitud “matches” o diferencias. El resultado evaluado debe ser invariable de las condiciones analíticas. Los datos analíticos deberían de ser evaluados de forma previa a su interpretación. Dependiendo del análisis realizado, se consideran los siguientes criterios:

- La línea basal o la denominación alélica debe ser revisada manualmente e independientemente por dos personas si es posible. Las adaptaciones manuales o mutaciones deberían ser registradas y almacenadas junto con el dato bruto.
- Para la secuenciación, cada posición debe ser una base determinada por al menos dos reacciones, que comiencen con diferentes cebadores si es posible o aplicable.
- Para el análisis de STR, la designación del alelo de la muestra sólo es posible si el mayor y menor de los alelos de esa muestra están dentro del rango cubierto por el estándar de tamaño interno.

²⁸ GILL P, SPARKES R, KIMPTON C. “Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system”. Forensic Science International 89(3) ,1997, págs. 185 y ss..

²⁹ BÄR W., BRINKMANN B., BUDOWLE B., CARRACEDO A., GILL P., HOLLAND M., LINCOLN P., MAYR W., MORLING N., OLAISEN B., SCHNEIDER P., TULLY G., WILSON M. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Int. J. legal Med. 113 (2000): 193-196 and Forensic Sci. Int. 110 (2000), págs.79 y ss.

³⁰ DAWNAY N., OGDEN R., THORPE R., POPE L., DAWSON D., MCEWING R. “A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: a framework for developing profiling systems for wildlife species”. FSI Genetics 2 , 2008, págs. 47 y ss..

- Los controles positivos y negativos que se tomen a través de los procesos analíticos deben ser evaluados. Cada laboratorio debería interpretar el umbral mínimo para la aceptación de los datos. Ejemplos de indicadores de calidad de los datos incluyen, por ejemplo, intensidades de señal, altura de picos y niveles de ruido de fondo.

3.4.1.7. Interpretación de los datos

La interpretación de los datos obtenidos de muestras biológicas no-humanas en casuística forense se discute con referencia a las tres principales cuestiones forenses, qué es, a quién o a qué pertenece y de dónde procede.

Algunas especies/poblaciones no se han sido ampliamente estudiadas y no son investigadas frecuentemente en casos forenses. La interpretación de los datos de ADN de estos especímenes no puede depender de datos de referencia para profundizar en los fenómenos como subestructura de la población, tasa de mutación de los marcadores genéticos, etc. La falta de datos genéticos de referencia, tiene por tanto una influencia en la interpretación de los datos: en muchas ocasiones las conclusiones deben valorarse en el contexto específico del caso y detallarse cuidadosamente en el informe.

Durante la interpretación se recomienda, si está disponible, el uso de datos de ADN de muestras de referencia o bases de datos forenses. Se debe prestar especial a la preevaluación de bases de datos abiertas, debido al sesgo o a que datos falsos pueden influir en la interpretación de forma negativa.

La clasificación taxonómica, individualización y asignación de población requiere unas bases de datos dedicadas que describan la población relevante y la variación dentro de ella. Los requerimientos adicionales de bases de datos serán discutidos para cada aplicación. La disponibilidad de las frecuencias de los datos permite la interpretación estadística de los resultados empleando la relación de verosimilitud o LR siguiendo el teorema de Bayes. Los datos de frecuencias deben apoyarse en una población de referencia representativa. En ausencia de datos relevantes, los estadísticos nominales no podrán ser aportados y deberá considerarse en su lugar una categoría estimada de probabilidad. La interpretación de datos de ADN de restos biológicos en una investigación forense también podría necesitar de expertos ecólogos relativos a especies concretas en investigación.

La interpretación podría, entonces, ser una combinación de ambos datos, genéticos y no genéticos. La interacción entre estos dos tipos de datos no está dentro del ámbito de aplicación de este MBP.

3.4.1.8. Base de datos de referencia

La base de datos seleccionada debería contener los taxones bajo consideración junto con especies conocidas que estén próximamente relacionadas genéticamente. Si no, las limitaciones de la base de datos de referencia deben ser descritas. La base de datos también debe contener múltiples especímenes de cada taxón. La determinación del origen de la evidencia requiere no solo datos de la población relevante, sino también conocimientos en ecología. Si es necesario se debe contactar con un experto en ese campo en particular. Las secuencias de ADN deberían ser comparadas con una base de datos de referencia apropiada para estudiar la coincidencia de la secuencia.

El investigador debe revisar la variación intraespecífica para esta secuencia y la distribución de las distancias genéticas entre las especies relacionadas más próximas. Los parámetros utilizados para una búsqueda en una base de datos pública deben ser evaluados para cada taxón y modificada si es necesario. Como las especies (taxón) de origen pueden no estar presentes en la base de datos, las no-coincidencias deben ser interpretadas para la atribución de especies (taxón). La identificación a nivel taxonómico puede ser evaluada por la construcción de un árbol filogenético que contenga la muestra desconocida y las secuencias de referencia de las especies disponibles más apropiadas. Las ramas deberían incluir una medida del soporte estadístico que se conoce que sea taxonómicamente robusta para la especie en cuestión.

3.4.1.9. Individualización y base de datos poblacional

Siguiendo con las recomendaciones del grupo ENFSI-APST, el objetivo de la individualización es comparar la muestra cuestionada a una muestra conocida utilizando, siempre que sea posible, un procedimiento

probabilístico. La base de datos poblacional se utiliza para estimar las frecuencias alélicas en la población que es apropiada para el espécimen en cuestión, si se dispone de ellas. Los alelos raros que no se encuentren en la base de datos deberían ser considerados durante el cálculo de las probabilidades de la coincidencia³¹. Se recomienda que se utilice una base de datos con suficiente variabilidad.

3.4.2. Recomendaciones (ENFSI-APST) particulares para el análisis del microbioma. Determinación de la composición de una población de microorganismos

La construcción final de un perfil bacteriano es muy sensible al método de extracción, PCR aplicada y subsecuente software de análisis aplicado (incluyendo los valores de *cutt-off* y normalización) durante la recogida de datos. Cuando se genera un perfil, este debe consistir en un conjunto de puntos de datos que debería corresponderse con especímenes conocidos (analizados con NGS, microarrays, etc.) o con especímenes de muestras desconocidas (analizados mediante T-RFLPs, RISA). En algunos casos, podría ser posible asignar poblaciones a un cierto origen (geográfico o nicho) utilizando información relativa a género o especie sin posterior procesamiento.

Generalmente, esto sólo puede lograrse cuando se aplican los mismos métodos a las muestras cuestionadas y muestras de referencia. Para realizar comparaciones, se necesita una medida objetiva de similaridad entre los perfiles bacterianos ya que una coincidencia exacta nunca se logrará debido a la variación biológica y técnica y a los efectos de muestreo. Para este propósito, las medidas de distancia ecológica (por ejemplo, Bray Curtis) u otros coeficientes de correlación pueden ser utilizados para expresar la similaridad entre las muestras³². Eligiendo un método apropiado la correlación depende de las características de los datos y las herramientas de procesamiento elegidas. Esto debería acompañarse con un modelo de decisión para definir qué similaridades deben ser tenidas en cuenta para que las muestras sean consideradas coincidentes o no coincidentes, cuando los datos no son concluyentes.

4. LA ECOLOGÍA BACTERIANA COMO ANTECESOR DE LA PRUEBA MICROBIOLÓGICA EN CRIMINALÍSTICA

El análisis microbiológico de suelos mediante técnicas de genética molecular ha sido propuesto en investigación forense como evidencia para determinar la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen³³. Aunque se demuestra que dicha técnica es efectiva a la hora de establecer semejanzas y diferencias entre las muestras que se cotejan, puede tener limitaciones derivadas de la ubicuidad de algunas especies de microorganismos.

Con los medios técnicos actuales se puede afrontar la búsqueda de la “aguja en el pajar”: se pueden aislar, identificar y caracterizar, genéticamente, las cepas bacterianas que constituyen las comunidades microbianas del suelo, pudiéndose además establecer relaciones comparativas mediante la filogenia molecular³⁴.

Desde LOCARD³⁵ muchos han sido los descubrimientos científicos y los avances tecnológicos que han hecho posible el desarrollo de la Criminalística. A raíz de la psicosis colectiva creada por la amenaza biote-

³¹ JOHNSON R.N., WILSON-WILDE L., LINACRE A. “Current and future directions of DNA in wildlife forensic science.” FSI Genetics 10, 2014, págs.1 a 11

³² QUAACK, F.C.A., KUIPER, I. “Statistical data analysis of bacterial T-RFLP profiles in forensic soil comparisons.” Forensic Science International 210, 2011, págs. 96 a 101. También UITDEHAAG, S.; QUAACK, F.; KUIPER, I.: “Soil Comparisons Using Small Soil Traces, A Case Report.” Capítulo 5 en Soil in Criminal and Environmental Forensics (Proceedings of the Soil Forensics Special, 6th European Academy of Forensic Science Conference, The Hague). Kars- van den Eijkel (The Netherlands). Springer International Publishing Switzerland 2016.

³³ HORSWELL, J. et al.: “Forensic Comparison of Soils by Bacterial Community DNA Profiling” en Journal of Forensic Sciences, 2002, nº 47, págs. 350 a 353.

³⁴ CORDERO PÉREZ, J.: “Análisis criminalístico de suelos (I). La aportación de la microbiología a la prueba pericial”...Op. cit., págs. 35 a 37.

³⁵ LOCARD, E. “La police et les méthodes scientifiques”. Editions Rieder, Paris, 1934. Pág.8 “Toute action de l’homme, et a fortiori, l’action violente qu’est un crime, ne peut pas se dérouler sans laisser quelque marque”. Traducido al Español significa “Cualquier acción de un individuo, y obviamente la acción violenta que constituye un crimen, no puede ocurrir sin dejar rastros”.

rrorista consistente en el envío de cartas que supuestamente contenían Anthrax y que tienen su origen en los tristemente célebres atentados del 11-S, se priorizó el estudio de la Microbiología como parte integrante de la investigación criminal, si bien el enfoque que se le dio en principio fue el de acotar e identificar claramente el o los microorganismos causantes de la amenaza y hacerle frente con eficacia.

Obviando los elementos discriminativos que pueden aparecer en la muestra de suelo y que, evidentemente, no se descartan en la investigación, ¿pueden dos muestras de suelo por sí mismas, por su propia naturaleza, ser relacionadas? ¿El suelo recogido del escenario del crimen está relacionado con el encontrado en las suelas de los zapatos del sospechoso?

La hipótesis principal de partida que se plantea es que la ecología microbiana, puede aplicarse en el estudio criminalístico de suelos. CORDERO³⁶ advirtió que el estudio genético de las poblaciones bacterianas podría ser útil en el estudio de suelos y, en consonancia con otro tipo de definiciones, propuso la de Microbiología Criminalística, definiéndola como “la aplicación de la metodología científica referida al análisis microbiológico en la resolución de un hecho delictivo”. Como ya se ha indicado esta definición propuesta se ampara, a su vez, en tres hipótesis:

1. El principio de transferencia es aplicable a los microorganismos.
2. Se ha de disponer de metodología adecuada para caracterizar los microorganismos aislados de las muestras.
3. La comparación entre cepas y/o poblaciones microbianas ha de ser significativa.

Se trata entonces de discernir por qué los organismos están en un sitio dado con ciertas abundancias en un tiempo determinado. Dentro del marco de estudio de la Ecología es importante evaluar la diversidad, abundancia y distribución de los organismos a diferentes escalas que van desde el paisaje, el ecosistema, las comunidades y finalmente las poblaciones de las diversas especies.

A pesar de que la diversidad genómica de los microorganismos en el agua y en el suelo puede ser distinta, el número máximo de individuos que integran el grupo dominante es similar: 10^4 - 10^5 individuos por gramo o mililitro. Como indica TORSVIK³⁷ este hallazgo sugiere que debe existir algún mecanismo o mecanismos que controlen la densidad de los taxa (especies) y que éstos deben funcionar de manera más o menos similar en todos los ambientes, mientras que los mecanismos que controlan la diversidad total de la comunidad bacteriana funcionan de modos distintos en agua y suelo. Existen algunas ideas sobre los mecanismos que controlan la diversidad bacteriana en el suelo:

La complejidad estructural del suelo y los sedimentos es importante para la diversificación referente a poblaciones porque esta complejidad permite que los recursos sean fraccionados y de esta manera se creen nuevos nichos con los que se incrementa la especialización y división en especies ecológicas nuevas.

SOROKIN y CANDELON³⁸ exponen que determinadas poblaciones estudiadas (*Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*) que viven en el mismo suelo, son genéticamente distintas y divergentes en mayor grado que las cepas de las mismas especies aisladas de diferentes localizaciones geográficas. Esto sugiere que la separación ecológica es probablemente la mayor causa entre separación/cohesión de material genético bacteriano, incluso más que el potencial de estas bacterias para intercambiar material genético entre ellas. QUAACK y KUIPER³⁹ también se adhieren a la hipótesis de que la ecología microbiana y el uso de técnicas moleculares auxiliares, sientan las bases para la aplicación de la Microbiología en el estudio criminalístico de suelos en lo referente a caracterización de las comunidades microbianas.

³⁶ CORDERO PÉREZ, J.: “Análisis...”...Op.cit, págs. 37 a 39.

³⁷ TORSVIK, V., ØVREÅS, L. y THINGSTAD, T.F. “Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors”. Science, n°296, 2002, págs. 1064 y ss.

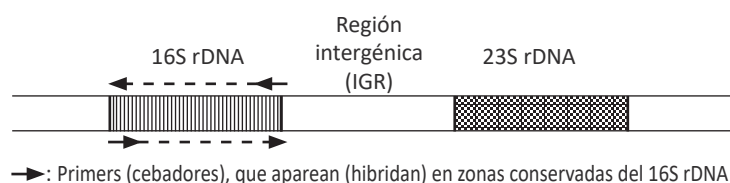
³⁸ SOROKIN, A.; CANDELON, B.; GUILLOUX, K.; “Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains”. Applied and Environmental Microbiology, VOL.72 N° 29, 2006, págs. 1569 y ss.

³⁹ QUAACK F.C.A., KUIPER I. “Statistical data analysis of bacterial T-RFLP profiles in forensic soil comparisons”. Forensic Science International 210, 2011, págs. 96 a 101. También FIERER N. “Forensic identification using skin bacterial communities”, vol. 107, n. 14, April 6, 2010, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107. En este caso utiliza técnicas de secuenciación a partir de aislados bacterianos de microbiota de piel humana en vez de en suelo, pero es interesante la propuesta a nivel forense. Al efecto, Cfr. UITDEHAAG, S.; QUAACK, F.; KUIPER, I.: “Soil Comparisons Using Small Soil Traces, A Case Report”. Capítulo 5 en Soil in Criminal and Environmental Forensics (Proceedings of the Soil Forensics Special, 6th European Academy of Forensic Science Conference, The Hague). Kars- van den Eijkel (The Netherlands) Springer International Publishing, Switzerland, 2016.

Se ha de estudiar el suelo donde, por ejemplo, se puede encontrar un cadáver, como el nicho ecológico de una comunidad microbiana característica constituida por determinadas especies concretas. Dicho estudio de las comunidades bacterianas que habitan el suelo se realiza utilizando técnicas que permiten comparar perfiles genéticos obtenidos, utilizando el rDNA 16S como molécula diana, como es el caso de la técnica T-RFLP.

Dicha técnica podría tener relativamente baja resolución, ya que existe cierta probabilidad de que varios filotipos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y representen un solo pico en la distribución y esto puede llevar, nuevamente, a subestimar la riqueza de especies, pudiéndose no caracterizar cepas de las especies bacterianas que constituyen poblaciones y comunidades estables en los suelos objeto de estudio. Sin embargo las técnicas en biología molecular han avanzado significativamente y, ayudándose de poderosos programas estadísticos, las comparativas de fragmentos genéticos (T-RFLP), procedentes de la microbiota de los suelos que se cotejan han aumentado considerablemente su poder resolutivo⁴⁰.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.



El ADNr 16S presenta características relevantes para su utilización como herramienta identificativa y comparativa:

1. Los trabajos de WOESE⁴¹ reflejan que se trata de un gen muy conservado, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una *diana universal* para su identificación. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios.
2. KONEMAN⁴² indica que “Las mutaciones en esta secuencia de bases altamente conservada suelen ser letales y los microorganismos con estas mutaciones no sobreviven ni se propagan. Además, como estas moléculas son una parte integral de un complejo, es decir, de la estructura que contiene la proteína (el ribosoma bacteriano), la transferencia horizontal de los rRNA a otros organismos es rara”.

El análisis de la secuencia de los ADNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan *Oligonucleótidos firma*⁴³. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (especie). Hay que tener en cuenta que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los rDNA 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas⁴⁴.

No obstante, en la práctica, la secuenciación del rDNA 16S es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas (por encima del nivel de género). Debido a que la molécula de rDNA 16S contiene

⁴⁰ MAC DONALD, C.; ANG, R.; ENG, B.; CORDINER, SJ.; HORSWELL, J. “Discrimination of Soils at Regional and Local Levels Using Bacterial and Fungal T-RFLP Profiling”. J. Forensic Science, Enero 2011, Vol. 56, No. 1 (doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01542.x).

⁴¹ OLSEN GJ, WOESE CR. “Ribosomal RNA: a key to phylogeny”. FASEB Journal, 1993, 7 Enero, págs. 113 y ss. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422957>

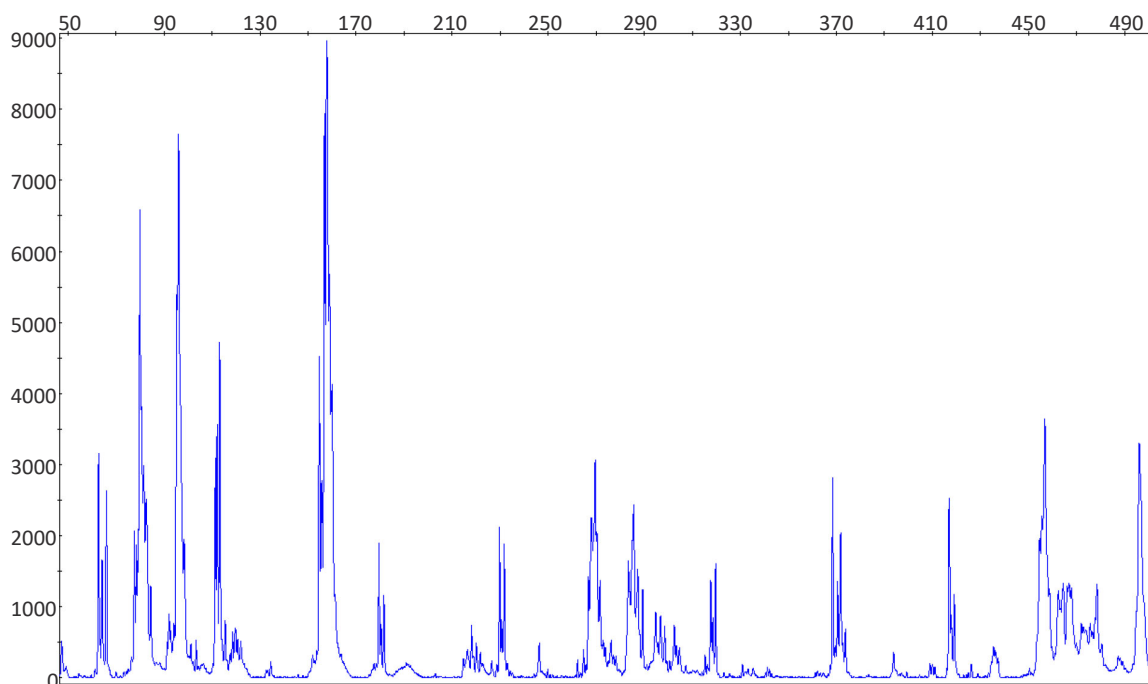
⁴² KONEMAN, E. “Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color”. Panamericana, 6ª Edición. Buenos aires, 2008, pág.164.

⁴³ WOESE, C.R., STACKEBRANDT, E., MACKIE, T.J., FOX, G.E. “A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa”. Systematic and Applied Microbiology 1985; vol.6 págs.143 y ss.

⁴⁴ RODICIO M., MENDOZA, M.C. “Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica”. En Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 22, núm. 4. Elsevier, 2004, pág.238.

regiones altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

La utilización de diferentes técnicas moleculares basadas en el rDNA 16S permite el estudio de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas del suelo, disponiéndose hoy día de herramientas adecuadas para poder efectuar dichos estudios.



Fragmentos de ADN bacteriano obtenidos de una muestra de suelo mediante análisis T-RFLP

Se han desarrollado numerosos métodos con el objetivo de examinar cuantitativa y cualitativamente las poblaciones microbianas en diversos ecosistemas. Para examinar microorganismos en sistemas naturales, basándose en el número total de individuos, en el número de poblaciones específicas, o en sus actividades metabólicas, se han analizado submuestras representativas de los mismos y los resultados se han aplicado a la totalidad de la comunidad o del ecosistema⁴⁵.

Aunque las muestras deben reflejar la diversidad y la densidad de organismos del ambiente del cual se han extraído, en muchos ambientes la distribución de microorganismos no es homogénea, sino irregular. Además, cada muestra individual es, por necesidad, minúscula en comparación con todo el medio en que ha sido realizado un muestreo; por tanto, esto puede llevar fácilmente a cálculos muy por encima o muy por debajo de la abundancia real.

Los métodos de detección de microorganismos usan medios de cultivo cuya composición permite normalmente aprovechar características específicas del organismo, como la capacidad de usar determinados nutrientes. Posiblemente los avances más importantes en la ecología microbiana en los últimos años proceden de la aplicación de técnicas moleculares para la detección de microorganismos en muestras ambientales.

El desarrollo de dichas técnicas permite detectar poblaciones microbianas concretas y se basan en la amplificación de secuencias de ADN y su detección por técnicas de hibridación, especialmente usando sondas de oligonucleótidos. Hoy en día, las técnicas basadas en ácidos nucleicos constituyen el principal medio para detectar poblaciones microbianas concretas en el ambiente.

Las relaciones filogenéticas de las bacterias, arqueobacterias y microorganismos eucariotas también pueden estimarse mediante el uso de secuencias génicas y de análisis molecular, lo cual permite tener una nueva pers-

⁴⁵ Cfr. ATLAS y BARTHA. "Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental", 4ª edición. Addison, Madrid, 2002, pág. 217.

pectiva del mundo microbiano natural. Las interrelaciones entre cepas microbianas de varios tipos de hábitat pueden estudiarse analizando su DNA para obtener su huella genética. Este método implica la secuenciación del DNA y la confrontación de dichas secuencias de nucleótidos de determinados genes. Este tipo de análisis en genes que codifican el RNA ribosómico (16S) se emplea para detectar las relaciones filogenéticas⁴⁶.

4.1. COMUNIDAD BACTERIANA Y HÁBITAT

La comunidad bacteriana es el conjunto de especies bacterianas que conviven en un mismo hábitat. Las poblaciones bacterianas están adaptadas a las condiciones bióticas y abióticas locales del suelo. Dichas condiciones pueden fluctuar durante las estaciones y mediante severos cambios ambientales. Normalmente ocurre que dichas poblaciones son estables dentro de periodos temporales relativamente pequeños.

Hábitat se define como la localización física donde viven los microorganismos. El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. En esos hábitat, los microorganismos son, por lo general, mucho más abundantes que en otros de agua dulce o marinos. Típicamente, en los hábitat del suelo se encuentran de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo. Los organismos que se encuentran en estas comunidades suelen ser mesófilos. Son aquéllos microorganismos que viven a temperaturas entre 20 y 45° C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 34-37 °C. Estos microorganismos conforman comunidades bacterianas que se encuentran asociadas al suelo o a materiales que hayan estado en contacto con el mismo.

Este hallazgo sugiere que debe existir algún mecanismo o mecanismos que controlen la densidad de los taxa (especies) y que éstos deben funcionar de manera más o menos similar en todos los ambientes, mientras que los mecanismos que controlan la diversidad total de la comunidad bacteriana funcionan de modos distintos en agua y suelo.

La complejidad estructural del suelo y los sedimentos son importantes para la diversificación de poblaciones porque esta complejidad permite que los recursos sean fraccionados y de esta manera se creen nuevos nichos con los que se incrementa la especialización y división en especies ecológicas nuevas⁴⁷.

ATLAS⁴⁸ indica que se designó como autóctona aquella parte de la comunidad microbiana del suelo que puede utilizar las sustancias húmicas refractarias. La actividad lenta, pero constante, es característica de estos organismos que, en su mayoría, son bacilos Gram negativos y Actinomicetos.

Los microorganismos oportunistas, por lo general, son incapaces de utilizar los compuestos húmicos, pero muestran una actividad intensa y un crecimiento rápido sobre sustratos fácilmente utilizables que están disponibles en forma de manto vegetal, excrementos animales y restos de animales muertos. Una actividad intermitente, con períodos inactivos de reposo, es una característica de los organismos oportunistas (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Mucor sp.*, entre otros). Sin embargo, oportunista no es sinónimo de alóctono. Aunque sólo estén activos de manera intermitente, los organismos oportunistas son verdaderas formas autóctonas del suelo.

El término alóctono debiera reservarse para los organismos que, como los patógenos de humanos y animales, no encuentran en el suelo las condiciones adecuadas para su desarrollo. Es difícil adscribir características adaptativas generalizadas a la microbiota del suelo. Sin embargo, los factores abióticos limitan el tipo de poblaciones microbianas que se pueden desarrollar en ellos y, por ello poseen características adaptativas que les permiten crecer.

ATLAS⁴⁹ en su obra también menciona que las bacterias con rasgos adaptativos, como la capacidad de formar endosporas del género *Bacillus sp.*, están bien preparadas para sobrevivir incluso en desiertos durante los periodos de tiempo entre las lluvias esporádicas que les proporcionan suficiente agua para crecer.

⁴⁶ Cfr. ATLAS y BARTHA. "Ecología Microbiana y Microbiología..." Op. cit, pág 227.

⁴⁷ TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T.F. "Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors..." Op.cit., págs. 1064 y ss.

⁴⁸ Cfr. ATLAS y BARTHA. "Ecología Microbiana y Microbiología ..."Op.cit., págs. 366 y ss.

⁴⁹ Cfr. ATLAS y BARTHA. "Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental..."Op. Cit., pág.369

La hipótesis de las islas de recursos para las poblaciones microbianas de los suelos desérticos predice que la abundancia de microorganismos seguirá los recursos disponibles y, por tanto, estarán uniformemente distribuidos en las praderas, pero desigualmente en la zona de arbustos, concentrándose allí alrededor de las plantas individuales.

En zonas con un mismo tipo de vegetación, su abundancia será proporcional a la densidad vegetal. En el suelo se desarrollan muchos géneros de bacterias. Es más elevada la proporción de bacterias Gram positivas en suelos que en los hábitats marinos o de agua dulce; sin embargo, en números absolutos, en los suelos predominan las Gram negativas⁵⁰.

Como ya se ha mencionado, SOROKIN y CANDELON⁵¹ indican que las poblaciones estudiadas por ellos de *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* que viven en el mismo suelo son genéticamente distintas y divergentes en mayor grado que las cepas de las mismas especies aisladas de diferentes localizaciones geográficas.

En una jerarquía ecológica organizada, son numerosas las poblaciones microbianas que forman parte de comunidades integradas de organismos que conviven en hábitats específicos. En las comunidades (conjuntos de poblaciones microbianas que viven e interaccionan en una determinada localización llamada hábitat) existen funciones específicas llamadas nichos. Los miembros autóctonos de las comunidades ocupan los nichos del ecosistema.

Generalmente, los microorganismos alóctonos que intentan invadir un ecosistema son eliminados, porque no son los mejor adaptados para ocupar los nichos de la comunidad. En algunos casos los microorganismos son eliminados de una comunidad por exclusión competitiva, pero algunos factores pueden permitir su coexistencia.

Las teorías actuales consideran las perturbaciones y la heterogeneidad ambiental como factores importantes que permiten la coexistencia de poblaciones competitivas en el mismo hábitat. Las comunidades se caracterizan generalmente por una gran diversidad, la cual refleja la estabilidad de la comunidad.

4.2. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S (rDNA16S) COMO HERRAMIENTA DE ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE SUELOS

Para el estudio de las bacterias y microorganismos que se encuentran en estas comunidades, se utiliza la identificación molecular del ADN ribosomal 16S. Es un polinucleótido que se emplea fundamentalmente para la identificación genética de bacterias debido a que, mediante otro tipo de técnicas, resultaría imposible, difícil o requeriría mucho tiempo. Esta identificación de una bacteria hasta la categoría taxonómica de especie no requiere necesariamente la secuenciación del rDNA16S completo, de hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'.

El ARN ribosómico 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs* también denominado ADN ribosomal 16S, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. La utilización de diferentes técnicas moleculares basadas en el rDNA 16S ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general y del suelo en particular. Hoy en día ya se dispone de completísimas bases de datos, para poder efectuar las identificaciones y comparaciones entre secuencias genéticas.

Actualmente se trabaja con las nuevas técnicas de Secuenciación Masiva (NGS) observando la diversidad de las especies que conforman las poblaciones y/o comunidades de un hábitat concreto, lo cual acepta de facto las premisas de la comunidad científica. Como ejemplo, FIERER⁵², en Estados Unidos ha descrito una de las metodologías que se practican en Criminalística aunque, en vez de practicar los análisis en muestras de suelo, trabajaron la microbiota de piel humana demostrando la especificidad de la microbiota bacteriana en cada ser humano y declarando la validez global del cotejo que efectuaron en un porcentaje que oscilaba entre 75-90%.

⁵⁰ Ídem.

⁵¹ SOROKIN, A.; CANDELON, B.; GUILLOUX, K.; "Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*" ...Op. cit., págs. 1569 y ss.

⁵² FIERER N.; LAUBER, C.; ZHOU, N.; MCDONALD, D.; COSTELLO, E.; KNIGHT, R. "Forensic identification using skin bacterial communities" en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, n. 14, April 6, 2010. Disponible en www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107.

4.3. LA TÉCNICA T-RFLP COMO HERRAMIENTA APLICABLE A ANÁLISIS CRIMINALÍSTICO DE SUELOS

El análisis de las comunidades microbianas en el ambiente también es posible por medio del método T-RFLP (*“Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”*). Esta técnica hace posible comparar cualitativamente las comunidades bacterianas presentes en muestras de suelo. Cuando utilizamos T-RFLP aplicamos el uso de fragmentos, marcados con fluorocromos, que también han sido amplificados por medio de PCR. Se trata de identificar las longitudes de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de las secuencias de ADN bacteriano que se comparan tras digestión enzimática.

En el análisis, la muestra de ADN se escinde en pedazos (digestión) mediante enzimas de restricción (RE) que reconocen sitios específicos conocidos como “sitios de restricción”. Estos productos con marcaje fluorescente terminal se obtienen durante la amplificación con PCR utilizando un cebador (“primer”) marcado con fluorocromo. Los fragmentos de restricción resultantes se separan electroforéticamente acorde a sus longitudes en un equipo de secuenciación genética y únicamente se detectan las bandas fluorescentes, es decir los fragmentos terminales obtenidos a partir de la digestión enzimática. Algunas ventajas de este método son:

- a) La alta resolución de la separación en un secuenciador automático de DNA.
- b) El uso de marcadores con diferente fluorescencia, permitiendo el análisis y comparación entre muestras
- c) La posibilidad de cuantificar bandas o “peaks” por intensidad de fluorescencia. La principal desventaja es el precio/muestra de la secuenciación automática, pero hay que tener en cuenta que los costes se minimizan significativamente conforme aumenta el número de muestras procesadas.

4.4. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S BACTERIANO. INSTRUCCIÓN TÉCNICA IT-M-212. VALIDACIÓN EFECTUADA Y ACREDITACIÓN COMO HERRAMIENTA CRIMINALÍSTICA

El siguiente apartado tiene como objetivo exponer que se desarrolló una metodología específica en el campo de la biología molecular, cuyo objetivo era la aplicación de la genética bacteriana al campo de la investigación criminalística. Para ello se adaptó un procedimiento comercial a los requerimientos periciales. En consonancia a la norma ISO 17025, se procedió a la validación del cultivo y posterior aislamiento de especies bacterianas procedentes del suelo, o cualquier otro material de interés criminalístico que haya estado en contacto con el mismo, así como su posterior identificación mediante secuenciación genética del **ADN ribosomal 16S** (r DNA16S) bacteriano de 500 pares de bases (pb). CORDERO y resto del equipo de Microbiología y genética no humana del laboratorio de la Guardia Civil desarrollaron e implementaron el procedimiento IT-M-212⁵³, que se describe a continuación.

INSTRUCCIÓN TÉCNICA IT-M-212 *“Cultivo, aislamiento e identificación, mediante secuenciación genética, de 500 pb del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) bacteriano, de bacterias mesófilas procedentes de muestras de suelo y/o materiales que hayan estado en contacto con el mismo.”* Los siguientes apartados describen someramente el protocolo mencionado:

4.4.1. Operaciones previas

En todos los casos, las muestras se conservaron a -20°C previo análisis. Las operaciones previas que se realizaron fueron las siguientes:

- Se atemperaron las muestras de ensayo a temperatura de laboratorio.
- Todo el material de plástico utilizado fue autoclavado a $121 \pm 3^\circ \text{C}$ durante 15 minutos en el autoclave.
- Limpieza, desinfección y acondicionamiento de las superficies de trabajo.

⁵³ Procedimiento IT-M-212, diseñado, implementado, validado por CORDERO (2007) y posteriormente acreditado por la ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN (ENAC) en el año 2010. <https://www.enac.es/documents/7020/f2228e13-7afd-44b3-a926-af91fa437555>

4.4.2. Procesamiento de muestras

El procesamiento de muestras se efectuó empleando dos estrategias dependientes del tipo de muestra: muestras de suelo y otros tipos de muestra en contacto con éste.

4.4.2.1. Preparación de muestras de suelo

Las muestras de suelo se extienden en bandejas de plástico con objeto de obtener muestras representativas. De cada bandeja se recolectaron cinco submuestras, una de cada esquina y una central, cuyo peso se midió con la balanza y que estuvo directamente relacionado con la cantidad de suelo total a analizar. El peso de cada una de las cinco muestras fue $20 \pm 0,08$ mg, formando un total entre las cinco de $100 \pm 0,4$ mg. Para cantidades de muestra mayor se tomaron $200 \pm 0,8$ mg para obtener una cantidad final de 1000 ± 4 mg.

Una vez pesadas, estas muestras tenían que guardar relación con su volumen. Aquellas de $200 \pm 0,8$ mg, se introdujeron en tubos de agua de peptona de 9 ml y aquellas cuya pesada final fue de 1000 ± 4 mg, en frascos de agua de peptona de 90 ml.

Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas con el vórtex durante 20 segundos medidos con el temporizador a una velocidad de 2500 revoluciones por minuto (rpm) e incubadas durante 24 ± 2 horas a una temperatura de $36 \pm 2^\circ \text{C}$ para su posterior identificación.

4.4.2.2. Preparación de muestras de otros materiales

Aquellas muestras que estuvieron en contacto directo con muestras de suelo de escenas del crimen (zapatillas, pantalones, camisas, etc.) se analizaron mediante la técnica de recorte. Se realizaron recortes inferiores a 1 cm^2 de aquellas zonas que presentaban restos de suelo o de aquellas zonas más susceptibles de haber estado en contacto con la muestra suelo obtenida de la escena del crimen (por ejemplo suela de zapatilla deportiva).

En el caso de detectar muestras de suelo residuales adheridas a soportes no absorbentes (madera, suelas de goma, etc.) susceptibles de ser recolectadas sin necesidad de recortes, se procede a su raspado, sin comprometer el soporte, mediante cuchilla estéril, teniendo precaución de recoger el raspado en bandeja estéril.

Se introducen los recortes o las muestras recolectadas mediante raspado en tubos de 9 ml de agua de peptona y se homogenizan con el vórtex durante 20 segundos medidos con el temporizador a una velocidad de 2500 rpm. Posteriormente se incuban durante 24 ± 2 horas a $36 \pm 2^\circ \text{C}$. Transcurridas las 24 ± 2 horas de incubación, se procede a su análisis morfológico y genético.

4.4.3. Medios de cultivo, reactivos y soluciones

A continuación, se enumeran los medios de cultivo, reactivos y soluciones disponibles comercialmente, utilizados en este procedimiento:

- Agua de peptona tamponada 0,1 % (frascos preparados de 90ml o de 9 ml). Disolución de uso general.
- Placas de base agar sangre 90 mm diámetro (comerciales).
- Placas de agar nutritivo 90 mm diámetro (comerciales)
- PrepMan Ultra® (reactivo de extracción).
- FAST microseq 500® (Kit de amplificación).
- Microseq 500® (Kit de secuenciación).
- Agua desionizada estéril.
- Formamida.
- Etanol al 96%.

4.4.4. Cultivo en medios sólidos generales

Una vez que las muestras se encuentran dentro de la cabina de seguridad, se toma con la pipeta automática de 2,5 µl, una alícuota de $2 \pm 0,2$ µl introduciendo la punta de la pipeta en los tubos o frascos de agua de peptona, a una profundidad aproximada de 0,5 centímetros. Se realizará cada alícuota por duplicado. Este sobrenadante se extenderá mediante asas de siembra, tanto en placas de agar sangre base, ya que es un medio en el que crecen muy bien las especies del género *Bacillus sp.*, como en placas de agar nutritivo.

Una vez sembradas, se incuban durante 24 ± 2 horas a una temperatura de $36 \pm 2^\circ \text{C}$. Pasadas estas 24 ± 2 horas, se procede a su análisis morfológico y genético. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, y sólo en aquellos casos de crecimiento microbiano en césped, se realizará una resiembra mediante la técnica de siembra por estrías para obtener colonias aisladas con la ayuda de asas de siembra de plástico estériles. Tras la resiembra se depositan en la incubadora a $36 \pm 2^\circ \text{C}$ otras 24 ± 2 horas.

4.4.5. Análisis morfológico

En este análisis se procede a la descripción de las características morfológicas fenotípicas, de los distintos tipos de colonias que se han aislado en los medios de cultivo sólidos generales. Nos centraremos en:

- Forma: puntiforme, circular, filamentosa, ahusada, rizoides, irregular.
- Elevación: plana, elevada, convexa, umbilicada, en forma de botón, pulviniforme (en forma de almohada).
- Borde: liso o continuo, ondulado o festoneado, lobulado, encrespado, filamentoso, corroido.
- Tamaño: mayor de 2 milímetros de diámetro (especificar), menor de dos milímetros de diámetro.
- Color.
- Superficie: brillante, mate, etc.
- Densidad: opaca, translúcida, transparente, otras.
- Consistencia: untuosa o mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza, etc.

Una vez descrita la morfología de las colonias, se procede a su análisis genético.

4.4.6. Análisis genético

Se realizó según el protocolo Microseq® de Applied Biosystems en un secuenciador genético apropiado para el análisis.

4.4.6.1. Extracción de ADN total bacteriano

La extracción de ADN total bacteriano, es el proceso mediante el cual eliminamos impurezas procedentes de la ruptura de la pared celular y orgánulos celulares, para finalmente obtener el ADN bacteriano total “limpio”.

A partir de las colonias bacterianas aisladas, “picamos” cada uno de los morfotipos distintos obtenidos y los introducimos en un tubo de centrífuga con capacidad nominal de 1,5 ml, donde hemos añadido previamente 100 ± 3 µl del reactivo de extracción con pipeta automática calibrada de 200 µl.

Estas muestras se incuban en baño termostático a una temperatura de $100 \pm 3^\circ \text{C}$, durante 10 minutos medidos con el temporizador. Transcurrido este tiempo, las muestras se homogenizarán durante 20 segundos, con ayuda del vórtex a una velocidad de 2500 rpm, para posteriormente ser centrifugadas durante 3 minutos a una velocidad de 13000 rpm.

Tras la centrifugación, se toman $75 \pm 2,25$ µl de sobrenadante final. De esta cantidad, únicamente $5 \pm 0,15$ µl, serán llevados a un tubo de centrífuga con capacidad nominal de 1,5 ml, en el cual se ha añadido previamente un volumen total de $495 \pm 14,85$ µl de agua con pipeta automática de 1000 µl. De esta forma, se alcanza

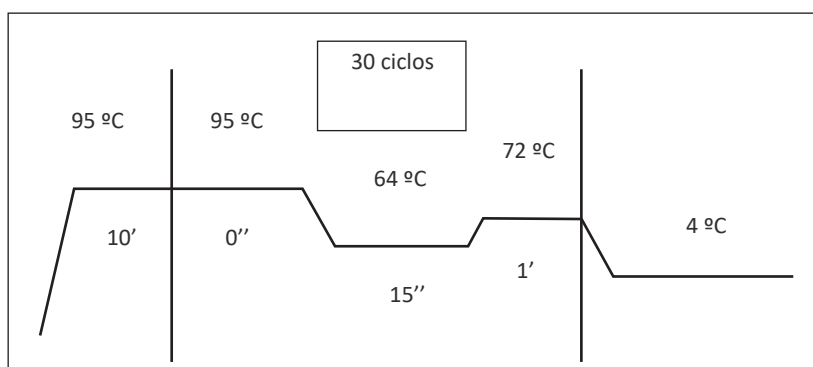
un volumen final de $500 \pm 15 \mu\text{l}$ (dilución 1:100), la cual se homogenizará durante $20 \pm$ segundos con el temporizador, a una velocidad de 2500 rpm con ayuda del vortex.

4.4.6.2. Amplificación de fragmentos de ADN_r16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction/PCR), consiste en la replicación una y otra vez de un mismo fragmento específico de ADN. Para ello es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar. Este sistema utiliza un par de oligonucleótidos cebadores (“primers”) que permiten amplificar un fragmento de 500 bp (pares de bases) mediante la PCR, correspondiente al extremo 5’ del ADN_r 16S. Este proceso se realiza en el termociclador.

Para ello se procede de la siguiente manera: se toman con ayuda de la pipeta automática de $20 \mu\text{l}$, $15 \pm 0,45 \mu\text{l}$ de la dilución 1:100 y $15 \pm 0,45 \mu\text{l}$ del reactivo de amplificación, obteniendo un volumen final para cada una de las muestras de $30 \pm 0,9 \mu\text{l}$ en tubos de plástico de centrifuga estériles, de capacidad nominal de 0,2 ml.

Se realizan en paralelo un control positivo con ADN_r 16S de *E.coli* y un control negativo añadiendo agua (controles del Kit de amplificación.) La rampa de temperaturas para el proceso de amplificación mediante la PCR es en este caso la siguiente:



4.4.6.3. Purificación de la PCR mediante columnas de filtración Centrisep®

Para purificar el producto de la PCR se utilizan columnas de filtración comerciales. Las columnas, deben ser previamente hidratadas con $800 \pm 2,4 \mu\text{l}$ de agua durante un tiempo medido con el temporizador de aproximadamente de 30-45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugan durante 2 minutos a una velocidad de 3000 rpm para eliminar todo el líquido sobrante de la hidratación. Se añaden los $30 \pm 0,9 \mu\text{l}$ del producto de la PCR y se centrifugan durante 2 minutos a 3000 rpm para obtener finalmente en el eluido el producto de la PCR purificado.

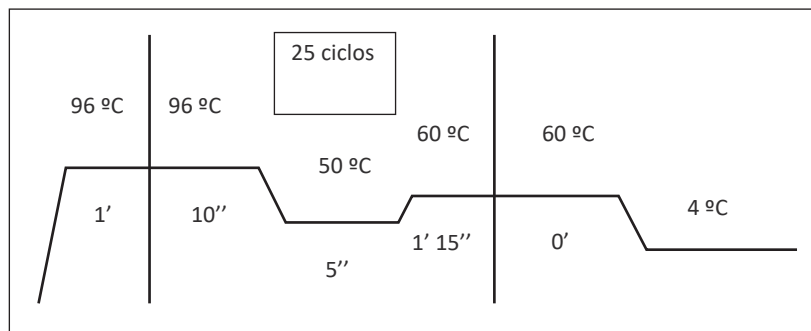
4.4.7. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación es una reacción de amplificación, que utiliza un iniciador (“primer”) por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. Este proceso se realiza en el termociclador.

Para la reacción de secuenciación se requiere un volumen final (para cada muestra) de $20 \mu\text{l}$: $13 \pm \mu\text{l}$ del kit de secuenciación y $7 \pm 0,21 \mu\text{l}$ resultantes de la purificación de la amplificación de los productos de la PCR. Estos volúmenes se añaden con la pipeta de volumen nominal de $20 \mu\text{l}$.

En este punto las muestras se duplican, por una parte se prepara la reacción para la cadena adelantada (Forward) y por otra parte la reacción para la cadena retrasada (Reverse). La rampa de temperaturas para el

proceso de secuenciación es la siguiente, realizándose en termociclador. La rampa de temperaturas para el proceso de secuenciación es la siguiente:



4.4.8. Purificación productos de secuenciación

Esta purificación se realiza mediante columnas de filtración, según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 4.4.6. Utilizamos un método alternativo de purificación del producto de secuenciación, en el que no es necesario el uso de columnas de filtración, cuando hemos de purificar más de veinte productos. Este método es la purificación etanólica.

Para este método se necesita la realización previa de dos soluciones de precipitación etanólica: *Mix 1* y *Mix 2*.

Éstas presentan la misma composición, pero con diferentes volúmenes.

- *Mix 1*: 8 ± ml de agua y 32 ± ml de Etanol al 96 %.
- *Mix 2*: 10,95 ± ml de agua y 32,85 ± ml de Etanol al 96 %.

Se mezclan en un tubo de capacidad nominal de 1,5 ml, 80 ± 2,4 µl del *Mix 1* y el producto resultante de la secuenciación con las pipetas automáticas de 20 µl para el producto de la secuenciación y de 200 µl para el volumen del *Mix 1*. Se homogeniza con ayuda del vórtex durante 20 segundos, medidos con el temporizador a una velocidad de 2500 rpm.

Tras reposar durante 15 minutos, medidos con el temporizador a temperatura ambiente y centrifugar a la máxima velocidad durante 20 minutos, se procede al volcado del sobrenadante en papel de filtro limpio. A continuación se adicionan 250 ± 7,5 µl del *Mezcla 2* con la pipeta automática de 1000 µl y se homogeniza con el vortex durante 20 segundos a una velocidad de 2500 rpm. Por último se procede a centrifugar a la máxima velocidad durante 10 minutos, para posteriormente secar en el concentrador a 60 °C durante 10 minutos.

4.4.9. Secuenciación automática

Si la purificación fue etanólica, una vez que los tubos eppendorf están bien secos, se añaden 20 ± 0,6 µl de formamida con la ayuda de la pipeta automática de 20 µl, y se dispensa ese volumen en la placa de lectura óptica del secuenciador.

Si la purificación fue mediante columnas de filtración, se dispensan en las placas de lectura óptica del secuenciador, 10 ± 0,3 µl resultantes de la purificación de los productos de secuenciación y el mismo volumen de formamida con la pipeta automática de 20 µl, obteniéndose un volumen final de 20 ± 0,6 µl.

Se introduce la placa en el secuenciador para su análisis genético. Finalmente con este análisis, obtenemos una identificación genética de cada una de las bacterias resultantes que crecieron en las placas de los medios SBA y Agar nutritivo una vez que se aislaron de la muestra de suelo inicial o de muestras que estuvieron en contacto con el mismo.

4.4.10. Identificación genética mediante ADNr 16S. Controles internos de calidad

Se procedió a fijar los siguientes parámetros de calidad para aceptar las secuencias obtenidas a partir de los aislados y utilizarlas para la identificación de los mismos.

- Las secuencias genéticas de los aislados obtenidos deben estar alineadas perfectamente, para lo cual se requiere el alineamiento, tanto de la secuencia adelantada (forward) como la retrasada (reverse). El número de bases alineadas debe ser superior a 400 pb.
- El control de calidad interno de las secuencias (Score QV) tiene que ser superior a 25.
- El porcentaje de identificación debe ser superior al 99%. En el caso concreto de la especie *Bacillus sphaericus* (y su variedad fusiformis) los porcentajes de identificación que habitualmente se obtienen en el laboratorio son del 97,5%-98,5%.

En este caso concreto se utilizaron las secuencias obtenidas de esta especie, ya que FIERER⁵⁴ había expuesto en sus trabajos un porcentaje mínimo de identificación del 97%, pero una vez evaluados internamente los resultados no resultaron satisfactorios para nuestro cotejo de suelos, por lo que el criterio lo fijamos definitivamente en >99%.

Si el control de calidad interno ha sido favorable, se procede a la evaluación de los criterios de aceptación o rechazo. La identificación asignada a las muestras analizadas se aceptará o se rechazará en base a dos parámetros obtenidos en el análisis:

- Specimen Score (QV).
- % Match.

El **Specimen Score** varía desde el rango de 10 a 50, siendo estos valores el mínimo y máximo valor asignado respectivamente a una muestra. Los valores comprendidos entre 25 y 40 nos indican un buen análisis de calidad, por lo que valores **mayores de 25** superan el criterio de aceptación y valores inferiores a este valor serán rechazados. Estos valores están asociados a un porcentaje (Pe), que es la probabilidad de error durante el análisis genético, producido en la etapa de asignación de bases.

Coincidencia o **Match** es el porcentaje de identificación resultante de cotejar la muestra analizada con la de la librería del equipo de secuenciación para obtener una identificación en tanto por ciento. Los valores de discordancia “mismatches” están directamente relacionados con los valores en % de Match. Los mismatches son las diferencias existentes entre las bases, al alinear la secuencia consenso obtenida con la de la librería. Por este motivo un porcentaje de identificación de Match del 100 %, corresponde a un valor total de mismatches de 0.

De esta forma, si los valores del QV son superiores a 25 y si el porcentaje Match representa un valor superior al 99 %, se supera el criterio de aceptación de la identificación genética asignada de la muestra analizada. Si no se cumple una o ninguna de las dos condiciones anteriores, no se supera el criterio de aceptación y por tanto se rechaza la identificación genética asignada a la muestra de suelo (o relacionada con éste) analizada.

5. VALIDACIONES TÉCNICAS INICIALES Y ASPECTOS GENERALES DEL COTEJO MICROBIOLÓGICO MEDIANTE EL EMPLEO DEL PROTOCOLO IT-M-212

5.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS PROCEDENTES DE DIVERSOS MATERIALES Y SUELO

El objetivo de los ensayos referidos en este apartado fue la validación de la metodología descrita en el protocolo IT-M-212 y la verificación del sistema de identificación genética basado en la secuenciación automatizada del ADNr 16S bacteriano.

⁵⁴ FIERER N.; LAUBER, C.; ZHOU, N.; MCDONALD, D.; COSTELLO, E; KNIGHT, R. “Forensic identification using skin bacterial communities” en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, n. 14, April 6, 2010. Disponible en www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107. Como ya se indicó, utiliza técnicas de secuenciación a partir de aislados bacterianos de microbiota de piel humana en vez de en suelo.

El estudio se centró en las bacterias mesófilas procedentes de muestras de suelo y/o materiales en contacto con las mismas (papel, poliespán, madera, látex, cartón, plástico, caucho, cristal, tela, cuero y algodón.). El alcance inicial, posteriormente conseguido y especificado en la instrucción técnica fue:

“Cultivo, aislamiento e identificación, mediante secuenciación genética, de 500 pb del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) bacteriano, de bacterias **mesófilas** procedentes de muestras de suelo y/o materiales que hayan estado en contacto con el mismo (papel, poliespán, madera, látex, cartón, plástico, caucho, cristal, tela, cuero y algodón.)”

Ampliar el estudio del suelo a los materiales descritos se hizo por interés de las investigaciones criminalísticas y forenses.

Los **parámetros, valores porcentuales y observaciones** del método descrito que se tuvieron en cuenta para la validación fueron los siguientes:

- **Identificación genética.** Porcentaje de exactitud en la asignación de bases y porcentaje de recuperación de las mismas mediante ensayos. Se utilizaron cepas de referencia, disponibles en el laboratorio proveniente de la NCTC⁵⁵, trazable a ATCC⁵⁶, para comprobar la validez de la metodología de identificación genética (secuenciación rDNA16S, 500pb) mediante comparación con la biblioteca del sistema descrita con anterioridad.
- **Recuperación (aislamiento) en diferentes matrices.** Se realizaron, para su confirmación, ensayos de identificación mediante pruebas bioquímicas específicas para las cepas ensayadas.

Una vez se comprobó que las identificaciones genéticas eran óptimas, se realizaron **ensayos de recuperación** de las cepas empleadas, ensayando en diferentes materiales (10 materiales, incluyendo suelo). En este punto bastó con realizar pruebas bioquímicas características de las especies empleadas, pues se trataba de demostrar que era viable su aislamiento siguiendo la metodología descrita anteriormente.

A continuación se exponen los resultados obtenidos de los diferentes ensayos de identificación, y recuperación de las bacterias en los distintos materiales y suelo.

5.1.1. Validación de la identificación genética del material de referencia bacteriano

El principal objetivo en este experimento fue la identificación genética del material de referencia. Se procedió a demostrar que las cepas de referencia con las que se pretendía validar la identificación genética eran recuperables e identificables tras su inoculación en medios de cultivo y posterior aislamiento, y así se pudo establecer el alcance del método de ensayo.

Se utilizaron cepas de referencia de los siguientes microorganismos: *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Estas cepas se revitalizaron en frascos de 90 ml de agua de peptona y se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a 36 ± 2 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron $9 \pm 0,3$ µl de cada uno de los frascos a 4 tubos de 9 ml de agua de peptona tomados con pipeta automática. Estos tubos se incubaron 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Después de su incubación y una vez que las muestras presentaron la turbidez adecuada, se tomaron con pipeta automática alícuotas de 2 µl (introduciendo la punta de la pipeta en los tubos de agua de peptona a una profundidad de aproximadamente 0,5 centímetros). Se procedió al cultivo por extensión de los sobrenadantes en placas de agar nutritivo (AN) de cada una de las muestras y en tubos, dependiendo del ensayo, de XLD Agar y Salmonella- Shigella. Se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

En XLD Agar y Salmonella- Shigella Agar se realizaron siembras tal y como se realizó con todas las muestras en placas de agar para poder así aislar, tras su incubación durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C. colonias bacterianas.

⁵⁵ National Collection of Type Cultures (NCTC). Colección inglesa de cultivos tipo. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc.aspx>

⁵⁶ American Type Culture Collection (ATCC). Colección americana de cultivos tipo.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción, amplificación y secuenciación de ADNr 16S para su análisis genético según protocolo IT-M-212.

5.1.2. Validación de la recuperación e identificación bioquímica del material de referencia bacteriano en muestras de suelo

El principal objetivo en este experimento fue la recuperación e identificación bioquímica del material de referencia con el que se doparon muestras de suelo, para demostrar que las cepas de referencia con las que se procedió a validar posteriormente la identificación genética eran recuperables e identificables mediante métodos puramente bioquímicos y así establecer el alcance del método de ensayo.

Se utilizaron cepas de referencia comerciales de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas cepas se revitalizaron en frascos de 90 ml de agua de peptona y se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a 36 ± 2 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron $9 \pm 0,3$ µl de cada uno de los dos frascos a 4 tubos de 9 ml de agua de peptona tomados con pipeta automática. Se realizó un control positivo del material de referencia, transfiriendo 9 µl de *E. coli* y de *P. aeruginosa* a un tubo de agua de peptona para cada uno de ellos. Estos 6 tubos se incubaron 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Las muestras de suelo fueron previamente autoclavadas durante 15 minutos a una temperatura de 121 ± 3 °C. Una vez que la tierra fue autoclavada, se introdujeron $100 \pm 0,4$ mg en los 4 tubos de 9 ml de agua de peptona que contenían también 9 µl de *E. coli* y 9 µl de *P. aeruginosa*.

Se realizó un control negativo al que no se añadió ningún inóculo de material de referencia, solo los 100 mg de suelo estériles. Los 7 tubos se homogenizaron empleando el vórtex durante 20 segundos (medidos con el temporizador) a una velocidad de 2500 revoluciones por minuto y se incubaron durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Después de su incubación y una vez que las muestras presentaron la turbidez adecuada, se tomaron con pipeta automática alícuotas de 2 µl (introduciendo la punta de la pipeta en los tubos de agua de peptona a una profundidad de aproximadamente 0,5 centímetros).

Se procedió al cultivo por extensión de los sobrenadantes tanto en placas de Agar sangre (BSA) como en placas de Agar nutritivo (AN) de cada una de las 7 muestras. Esta extensión se hizo por duplicado para cada una de las muestras. Se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la identificación mediante análisis bioquímico, mediante las siguientes pruebas: oxidasa, ureasa e indol o urea-indol, presencia/ausencia de pigmentación (piocianina).

Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a la identificación de las colonias obtenidas. Este experimento se repitió **dos** veces, obteniéndose los mismos resultados.

En la tabla siguiente (**Tabla 1**) se presentan los resultados obtenidos en los ensayos previamente descritos.

	ENSAYO	MEDIO DE CULTIVO	CRECIMIENTO	<i>E.coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		IDENTIFICACIÓN
				Indol	Ureasa	Oxidasa	Piocianina	Oxidasa	
Tubo 1	1	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 2	1	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 3	1	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 4	1	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
C+E. coli	1	SBA	1 tipo colonial	+	-	-	nr	nr	Escherichia coli
		Agar nutritivo	1 tipo colonial	+	-	-	nr	nr	Escherichia coli



C+P.aeruginosa	1	SBA	1 tipo colonial	nr	-	nr	presencia	+	Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	1 tipo colonial	nr	-	nr	nd	+	Pseudomonas aeruginosa
C-medio cultivo	1	SBA	no crecimiento						
		Agar nutritivo	no crecimiento						
Tubo 1	2	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 2	2	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 3	2	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
Tubo 4	2	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	presencia	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	E.coli, Pseudomonas aeruginosa
C+E. coli	2	SBA	1 tipo colonial	+	-	-	nr	nr	Escherichia coli
		Agar nutritivo	1 tipo colonial	+	-	-	nr	nr	Escherichia coli
C+P.aeruginosa	2	SBA	1 tipo colonial	nr	-	nr	presencia	+	Pseudomonas aeruginosa
		Agar nutritivo	1 tipo colonial	nr	-	nr	nd	+	Pseudomonas aeruginosa
C-medio cultivo	2	SBA	no crecimiento						
		Agar nutritivo	no crecimiento						

Tabla 1: resultados parciales obtenidos en la validación de la recuperación e identificaciones bioquímicas de materiales de referencia (cepas certificadas) bacterianos en suelo.

5.1.3. Recuperación e identificación bioquímica de material de referencia bacteriano en diferentes materiales

El objetivo de este experimento fue la recuperación e identificación mediante *bioquímica* del material de referencia (cepas bacterianas certificadas) en distintos tipos de materiales. Se trataba de demostrar que las cepas de referencia con las que se validaría posteriormente la identificación genética eran recuperables en los materiales estudiados y así poder establecer el alcance del método de ensayo. Estos ensayos se realizaron entre el 03/12/2008 y el 16/12/2008.

Se utilizaron tres cepas de referencia: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Estas cepas se revitalizaron en frascos de 90 ml de agua de peptona y se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a 36 ± 2 °C (las tres especies son mesófilas). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 300 ± 9 µl de inóculo con ayuda de la pipeta automática a cada uno de los frascos a tubos de 9 ml de agua de peptona, para así obtener un volumen de 9 ml de agua de peptona y 900 µl (300 µl de cada frasco) de las tres cepas inoculadas. Estos tubos se incubaron 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

A continuación, se procedió a la inoculación de los materiales con las cepas revitalizadas del material de referencia. Para este experimento se utilizaron 15 tipos de materiales, por duplicado:

- Papel, poliespán, madera, látex, cartón, plástico, papel de aluminio, goma (de borra), caucho, cristal, tela (65% poliéster y 35% algodón), material orgánico (cáscara de plátano), cuero, algodón y cobre.

Los materiales fueron, previamente a la inoculación con cepas de referencia, autoclavados durante 15 minutos a una temperatura de 121 ± 3 °C. Una vez que los materiales fueron autoclavados, se introdujeron en los tubos de peptona de 9 ml y se dejaron durante 30 minutos para su inoculación con el material de referencia.

Transcurrido este tiempo, se dejaron secar durante 72 ± 2 horas en las cabinas de seguridad dentro de placas de petri estériles.

Una vez secos, se introdujeron en tubos nuevos de agua de peptona de 9 ml, se homogeneizaron con el vórtex durante 20 segundos (medidos con el temporizador) a una velocidad de 2500 revoluciones por minuto y se incubaron durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Transcurridas las primeras 24 horas de incubación, la turbidez de los tubos de agua de peptona no fue la esperada por lo que se dejaron otras 24 ± 2 horas a 36 ± 2 °C.

Después de su incubación, y una vez que las muestras presentaron la turbidez adecuada, se tomaron con pipeta automática alícuotas de 2 µl (introduciendo la punta de la pipeta en los tubos de agua de peptona a una profundidad de aproximadamente 0,5 centímetros).

Se procedió al cultivo por extensión de los sobrenadantes tanto en placas de base agar sangre (BSA) como en placas de agar nutritivo (AN). Esta extensión se hizo por duplicado para cada una de las muestras. Se dejaron incubar durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 36 ± 2 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó resiembra mediante la técnica de siembra por estría para obtener colonias aisladas sólo en aquellos casos de crecimiento microbiano en césped, en el resto se obtuvieron colonias aisladas a las 24 horas (ver tabla 5). Las placas de resiembra se incubaron a 36 ± 2 °C otras 24 ± 2 horas.

Tras estas 24 ± 2 horas ó 48 ± 2 horas (en el caso de resiembra), se procedió al análisis bioquímico, medianamente las siguientes pruebas: oxidasa, ureasa e indol o urea-indol, presencia/ausencia de pigmentación (piocianina) y crecimiento y confirmación en bilis esculina a 44 °C (BEA).

Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a la identificación de las colonias. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente (Tabla 2).

MATRIZ	MEDIO CULTIVO	24h/48h	E. coli			Pseudomonas aeruginosa		E. faecalis	IDENTIFICACIÓN
		Crecimiento	Indol	Ureasa	Oxidasa	Piocianina	Oxidasa	BEA	
Papel	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Poliésfán	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Madera	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Látex	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	nd	nd	nd	nd	+	+	Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	nd	nd	nd	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	+	
Cartón	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Plástico	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Papel aluminio	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	nd	nd	nd	nd	+	+	Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	nd	nd	nd	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	+	
Goma de borrar	Agar Nutritivo	1 tipo colonial	nd	nd	nd	nd	+	nd	Pseudomonas
	Agar Nutritivo	1 tipo colonial	nd	nd	nd	nd	+	nd	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	nd	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	nd	
Caucho	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	3 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
Cristal	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	3 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
	SBA	3 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
Tela	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	3 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	3 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
	SBA	3 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
Cáscara de plátano	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	nd	nd	nd	nd	+	nd	Pseudomonas
	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	nd	nd	nd	nd	+	nd	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	nd	
	SBA	cesped/resiembra	nd	nd	nd	+	+	nd	
Cuero	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	cesped/resiembra	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
	SBA	cesped/resiembra	+	-	-	+	+	+	
Algodón	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	E.coli, Pseudomonas y Enterococos
	Agar Nutritivo	2 tipos coloniales	+	-	-	nd	+	+	
	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
	SBA	2 tipos coloniales	+	-	-	+	+	+	
Cobre	Agar Nutritivo	No crecimiento							
	Agar Nutritivo	No crecimiento							
	SBA	No crecimiento							
	SBA	No crecimiento							

Tabla 2: resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a las cepas de referencia bacterianas y ser aisladas de diferentes materiales tras su inoculación (nd: no detectado; +: reacción positiva a la prueba efectuada; -: reacción negativa). En la columna "identificación" se consignan cuáles de las cepas fueron identificadas en cada material estudiado.

Una vez efectuados los ensayos previos mencionados se procedió a la identificación genética de los aislados bacterianos obtenidos de los diferentes materiales. **Los resultados obtenidos, que condujeron a la validación del protocolo IT-M-212 se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3).**

RESUMEN VALORES OBTENIDOS			
PARÁMETRO	RESULTADO	OBSERVACIONES	DECISIÓN
IDENTIFICACIÓN GENÉTICA	99,46%	Las identificaciones son correctas y coincide trazabilidad del MR. Se descubre que la cepa comercial de Salmonella entérica (serov. typhimurium) puede estar mutada y la calidad no es la deseada. No obstante para ensayos de aguas sí es válida como control.	APTO
EXACTITUD (SCORE)	0,02% (QV37)		
RECUPERACIÓN MEDIA DE BASES (SOBRE 500 pb)	96%		
RECUPERACIÓN Y AISLAMIENTO DE DIVERSOS MATERIALES	Se aísla el 100% de las cepas ensayadas en 11 de 16 matrices	En goma de borrar y cáscara de plátano P. aeruginosa desplaza a las otras dos cepas y es la única que se aísla. El papel de aluminio y el látex no son viables para E. coli y el cobre de la moneda (usado como control negativo, efectivamente evita el crecimiento de las especies ensayadas.	APTO

Tabla 3: Resume los valores obtenidos en validación protocolo IT-M-212

5.2. VALIDACIÓN DEL COTEJO ESTADÍSTICO REALIZADO ENTRE SECUENCIAS GENÉTICAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE MUESTRAS DE SUELOS CON EL PROTOCOLO IT-M-212

El objeto de esta validación fue evaluar la capacidad discriminativa, en términos porcentuales, del cotejo comparativo genético-bacteriano una vez aplicado el procedimiento acreditado IT-M-212, para establecer los parámetros en los que se había de ejecutar el ensayo a nivel estadístico, permitiéndose la discriminación de falsos positivos y falsos negativos. Estos trabajos se realizaron entre noviembre 2012 y junio 2013.

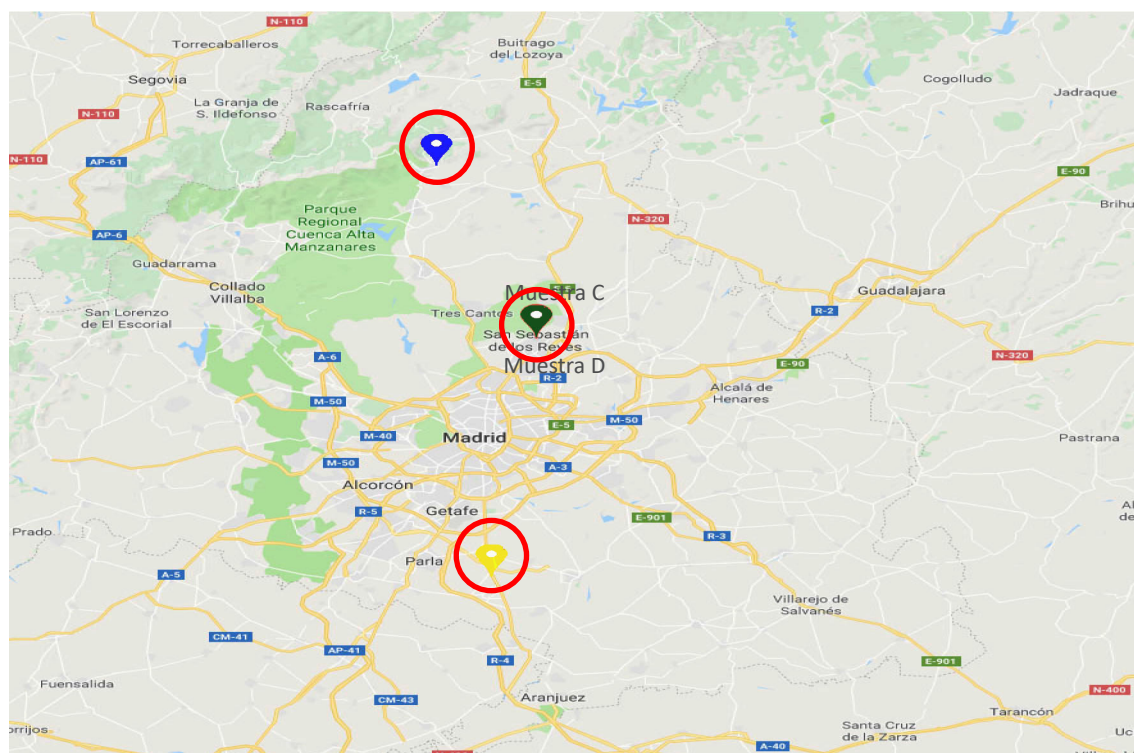
Dicha validación pretendía la optimización y fijación de los **parámetros**⁵⁷ más adecuados en previsión de problemas de interpretación si se utilizaba el cotejo genético-bacteriano de forma independiente. Como cuestión previa se ha de indicar que el análisis de suelos es un análisis multidisciplinar y se utiliza la analítica genética bacteriana como parte de la totalidad de los análisis efectuados a las muestras de suelo, entre los que citamos, por ejemplo, los estudios de Difracción de Rayos X.

Se procedió a la toma de 6 muestras de suelo, procedentes de diferentes ubicaciones y que se denominaron A, B,C,D,E y F. Todas las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas y de forma superficial (a menos de 5 cm de profundidad) en Diciembre de 2012.

- *Muestra A:* se tomaron en un descampado de la c/ Río Jucar , de la población de Miraflores de la Sierra (Madrid). Dicha muestra presentaba humedad como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.
- *Muestra B:* se tomó en una parcela de la c/ Río Jucar , a 20m de la anterior, de la población de Miraflores de la Sierra (Madrid). Dicha muestra estaba levemente húmeda como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.
- *Muestra C:* se tomó en un jardín de la Avda. del Juncal, de la población de San Sebastián de los Reyes (Madrid). Dicha muestra estaba levemente húmeda como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.

⁵⁷ Ver apartado 5.2.2

- *Muestra D*: se tomó en un descampado anexo a jardines de la Avda. del Juncal, de la población de San Sebastián de los Reyes (Madrid), a 1000 metros de la anterior. Dicha muestra estaba mojada como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.
- *Muestra E*: se tomó en un solar cerrado y abandonado, limitado por muros y no accesible en c/ Fortuny, de la población de Valdemoro (Madrid). Dicha muestra estaba húmeda como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.
- *Muestra F*: se tomó en un solar abierto y abandonado, a 50 metros del anterior, pero separado de éste por carretera en c/ Dali, de la población de Valdemoro (Madrid). Dicha muestra estaba húmeda como consecuencia de las lluvias registradas en la fecha de la toma.



MUESTRAS A y B (marcador azul), C y D (verde) E y F (amarillo)

Las muestras descritas se dividieron en cuatro fracciones cada una, obteniéndose al final 24 muestras: A1...A4, B1...B4,...F1...F4, procediéndose a la realización de los ensayos como se describe en el apartado siguiente.

Los aislados genéticos bacterianos obtenidos de submuestras procedentes de una misma ubicación se cotejaron entre sí, con lo que el resultado final debía permitir un cotejo positivo inequívoco entre las especies estudiadas.

Análogamente, los aislados obtenidos de las submuestras se cotejaron de forma general, comparándolas entre sí de forma que, al proceder de diferentes ubicaciones se debía obtener un cotejo negativo inequívoco entre las especies estudiadas.

En el estudio realizado se aplicaron las siguientes técnicas analíticas y métodos de preparación de muestras:

1. Análisis microbiológico mediante técnica de preenriquecimiento en cultivo no selectivo (peptona salina -Cultimed- 0,1%) incubando 24 horas a 36 ± 2 °C (cultivo previo) y posterior siembra por extensión de 0,2 ml por placa en medios de cultivo general (Agar nutritivo-Cultimed) y diferencial (BSA) incubando otras 24 horas a 36 ± 2 °C para obtención de aislados bacterianos mesófilos en general.

- Análogamente se utilizaron medios selectivos (Tergitol y CCA Cromogénico) para aislamiento específico de Enterobacteriáceas. En este caso se procedió a la dilución de 10 µl del cultivo previo descrito en el apartado anterior en 90 µl de peptona salina (-Cultimed- 0,1%) y posterior filtración en membrana.
- Diagnóstico de individualización mediante rDNA 16S bacteriano, siguiendo el protocolo descrito como IT-M-212 en el apartado 4.

Los resultados de los análisis genéticos obtenidos en cada una de las submuestras se reflejan en las tablas siguientes. A partir de dichos resultados se procedió a la evaluación estadística del cotejo.

5.2.1. Resultados de identificación genética bacteriana de las muestras de suelo analizadas (tablas 4 a 9)

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF.	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
A1	AGAR NUTRIT/63370	A1MT01	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,18%	35	480	497
		A1MT02	ATCC 17922	99,70%	31	454	484
		A1MT03	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,40%	32	471	497
		A1MT14	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,79%	35	485	498
	CBA/2220352261	A1MT15	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,16%	34	477	497
		A1MT16	13047	99,95%	34	484	487
		A1MT27	NO ID		0		
		A1MT28	31898	99,82%	27	486	487
	TERGITOL/62248	A1MT34	Enterobacter kobei CCM 2538	99,94%	32	491	487
		A1MT35	Enterobacter kobei CCM 2538	99,77%	26	430	487
		A2MT04	Bacillus fusiformis ATCC 7055	98,23%	31	478	497
		A2MT05	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,96%	35	490	498
A2	AGAR NUTRIT/63370	A2MT06	Enterobacter cloacae cloacae ATCC	99,92%	33	485	487
		A2MT17	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,93%	37	482	498
		A2MT18	Enterobacter cloacae cloacae ATCC	99,95%	34	491	487
		A2MT19	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,13%	35	487	497
	CBA/2220352261	A2MT29	Enterobacter kobei CCM 2538	99,88%	30	485	487
		A2MT30	Enterobacter hormaechei ATCC	99,94%	27	361	489
		A2MT36	Enterobacter kobei CCM 2538	99,85%	21	292	487
		A2MT37	NO ID		0		
	TERGITOL/62248	A3MT07	Escherichia hermannii ATCC 33650	99,74%	34	461	489
		A3MT08	Enterobacter kobei CCM 2538	99,55%	35	483	487
		A3MT09	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,77%	34	487	497
		A3MT10	Bacillus thuringiensis DSM 6110	100,00%	38	481	498
A3	AGAR NUTRIT/63370	A3MT20	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,86%	35	473	497
		A3MT21	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,91%	34	471	498
		A3MT22	Enterobacter kobei CCM 2538	99,91%	33	492	487
		A3MT23	Acinetobacter baumannii ATCC 19606	99,92%	28	67	484
	CBA/2220352261	A3MT31	Enterobacter kobei CCM 2538	99,98%	29	366	487
		A3MT38	Enterobacter kobei CCM 2538	99,92%	30	441	487
	TERGITOL/62248	A4MT11	Enterobacter cloacae cloacae ATCC	99,91%	32	484	487
		A4MT12	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,58%	22	418	498
		A4MT13	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,89%	30	472	497
		A4MT24	Bacillus sphaericus ATCC 14577	99,99%	34	479	498
A4	AGAR NUTRIT/63370	A4MT25	Bacillus thuringiensis DSM 6110	97,86%	32	485	497
		A4MT26	Escherichia coli ATCC 53503	99,88%	33	491	489
		A4MT32	13047	99,91%	32	462	487
		A4MT33	23055	99,78%	30	470	484
	CBA/2220352261	A4MT39	Enterobacter kobei CCM 2538	99,93%	28	442	487
		A4MT40	13047	99,92%	30	454	487
	TERGITOL/62248						
	CCA CHROMOG /63854						

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
99,44%	30	452
		% Recuperación bases
		90

Tabla 4: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras A1...A4, a su vez procedentes de la muestra A (Miraflores de la Sierra). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF.	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
B1	AGAR NUTRIT/63370	B1MT01	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,85%	28	462	498
		B1MT02	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	99,97%	34	486	484
		B1MT03	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,88%	35	478	497
	CBA/2220352261	B1MT15	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,96%	34	471	498
		B1MT16	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,99%	34	482	497
		B1MT17	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	99,97%	33	485	484
	TERGITOL/62248	B1MT28	Enterobacter kobei CCM 2538	99,76%	27	484	487
		B1MT29	Leclercia adecarboxylata ATCC 23216	99,92%	33	479	487
	CCA CHROMOG /63854	B1MT35	Enterobacter kobei CCM 2538	99,50%	33	441	487
		B1MT36	NO ID.				
B2	AGAR NUTRIT/63370	B2MT04	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,96%	33	479	498
		B2MT05	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	99,95%	31	485	484
		B2MT06	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,80%	33	474	497
	CBA/2220352261	B2MT18	Acinetobacter genomospecies ATCC 17922	99,77%	34	486	484
		B2MT19	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,91%	35	495	497
		B2MT20	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,97%	35	475	498
	TERGITOL/62248	B2MT21	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	36	482	501
		B2MT30	Enterobacter cloacae cloacae ATCC 13047	99,53%	31	444	487
	CCA CHROMOG /63854	B2MT31	NO ID.				
		B2MT37	Aeromonas media ATCC 33907	99,70%	33	438	491
B3	AGAR NUTRIT/63370	B2MT38	Buttiauxella izardii CCM 4877	99,85%	27	195	487
		B3MT07	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,99%	29	475	498
		B3MT08	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	99,63%	24	424	484
	CBA/2220352261	B3MT09	Enterobacter cancerogenus ATCC 33241	99,80%	32	485	487
		B3MT10	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,02%	35	475	497
		B3MT22	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	99,94%	32	483	501
	TERGITOL/62248	B3MT23	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,00%	29	480	497
		B3MT24	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,84%	32	471	498
	CCA CHROMOG /63854	B3MT32	Escherichia coli ATCC 53503	99,73%	29	444	489
		B3MT39	NO ID.				
B4	AGAR NUTRIT/63370	B4MT11	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	36	490	501
		B4MT12	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,90%	35	478	497
		B4MT13	Escherichia hermannii ATCC 33650	99,72%	35	492	489
	CBA/2220352261	B4MT14	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	100,00%	34	481	484
		B4MT25	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	99,95%	35	475	501
		B4MT26	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,81%	33	472	497
	TERGITOL/62248	B4MT27	Enterobacter kobei CCM 2538	99,52%	31	488	487
		B4MT33	Escherichia coli ATCC 53503	99,88%	32	458	489
	CCA CHROMOG /63854	B4MT34	Enterobacter kobei CCM 2538	99,90%	33	445	487
		B4MT40	Escherichia coli ATCC 10536	99,95%	27	366	489
		B4MT41	Enterobacter sakazakii ATCC 29544	98,46%	32	458	489

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
99,40%	32	462
		% Recuperación bases
		92

Tabla 5: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras B1...B4, a su vez procedentes de la muestra B (Miraflores de la Sierra2). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF.	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
C1	AGAR NUTRIT/63370	C1MT1	Bacillus thuringiensis DSM6110	100,00%	38	498	498
		C1MT2	Exyguobacterium acetylum ATCC953	91,18%	27	479	507
		C1MT3	Oceanimonas doudoroffii ATCC27123	95,73%	37	493	491
	CBA/2220352261	C1MT13	Bacillus cereus ATCC14579	99,97%	30	483	498
		C1MT14	Bacillus fusiformis ATCC7055	99,74%	31	225	497
		C1MT15	Bacillus fusiformis ATCC7055	98,15%	29	444	497
	TERGITOL/62248	C1MT25	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	98,46%	33	469	489
		C1MT26	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,22%	32	417	489
		C1MT33	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	98,92%	28	367	489
	CCA CHROMOG /63854	C1MT34	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	98,49%	33	477	489
		C2MT4	Bacillus fusiformis ATCC7055	99,24%	33	152	497
C2	AGAR NUTRIT/63370	C2MT5	Exyguobacterium acetylum ATCC953	90,79%	37	497	507
		C2MT6	Pseudomonas pertucinogena ATCC190	96,26%	32	481	483
		C2MT16	Exyguobacterium acetylum ATCC953	90,42%	34	500	507
	CBA/2220352261	C2MT17	Bacillus sphaericus ATCC14577	97,99%	36	495	497
		C2MT18	No Id				
	TERGITOL/62248	C2MT27	Oceanimonas doudoroffii ATCC27123	97,65%	29	435	491
		C2MT28	Oceanimonas doudoroffii ATCC27123	96,55%	31	486	491
		C2MT35	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	97,39%	23	347	489
	CCA CHROMOG /63854	C2MT36	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,80%	30	471	489
		C3MT7	Bacillus sphaericus ATCC14577	97,85%	38	482	497
C3	AGAR NUTRIT/63370	C3MT8	Exyguobacterium acetylum ATCC953	90,53%	36	508	507
		C3MT9	Pseudomonas pertucinogena ATCC190	96,15%	35	482	483
		C3MT19	Bacillus sphaericus ATCC14577	97,94%	37	495	497
	CBA/2220352261	C3MT20	Exyguobacterium acetylum ATCC953	81,58%	27	477	507
		C3MT21	Bacillus sphaericus ATCC14577	97,94%	38	493	497
		C3MT29	Providencia stuartii (ATCC29914)	99,81%	28	419	487
	TERGITOL/62248	C3MT30	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,87%	35	442	489
		C3MT37	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,76%	23	342	489
	CCA CHROMOG /63854	C3MT38	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	89,41%	23	298	489

C4	AGAR NUTRIT/63370	C4MT10	Bacillus fusiformis ATCC7055	98,26%	32	478	497
		C4MT11	Exyguobacterium acetylicum ATCC953	93,91%	22	264	507
		C4MT12	Pseudomonas pertucinogena ATCC190	96,09%	33	484	483
		C4MT22	Exyguobacterium acetylicum ATCC953	90,74%	36	509	507
	CBA/2220352261	C4MT23	Bacillus cereus ATCC14579	99,97%	35	474	498
		C4MT24	Bacillus sphaericus ATCC14577	98,29%	33	411	497
		C4MT31	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	98,56%	31	437	489
	TERGITOL/62248	C4MT32	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	98,51%	34	474	489
		C4MT39	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,76%	30	413	489
	CCA CHROMOG /63854	C4MT40	Alcaligenes faecalis faecalis ATCC8750	99,69%	33	473	489

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
96,68%	32	438
		% Recuperación bases
		88

Tabla 6: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras C1...C4, a su vez procedentes de la muestra de la muestra C (San Sebastián de los Reyes). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
D1	AGAR NUTRIT/63370	D1MT1	Aeromonas hydrophila hydrophila ATCC7966	99,80%	34	433	491
		D1MT2	Bacillus thuringiensis DSM6110	100,00%	37	482	498
		D1MT3	Aeromonas veronii CECT4199	99,95%	33	465	491
		D1MT13	Bacillus thuringiensis ATCC10792	99,82%	35	487	498
	CBA/2220352261	D1MT14	Bacillus thuringiensis DSM6091	99,84%	36	471	498
		D1MT21	Bacillus fusiformis ATCC7055	99,44%	29	169	497
		D1MT22	Aeromonas media ATCC33907	99,79%	33	487	491
	TERGITOL/62248	D1MT29	Aeromonas caviae ATCC15468	99,85%	26	348	491
		D1MT30	Aeromonas hydrophila hydrophila ATCC7966	99,67%	29	438	491
	CCA CHROMOG /63854	D1MT31	Aeromonas hydrophila hydrophila ATCC7966	99,68%	30	443	491
D2	AGAR NUTRIT/63370	D2MT4	Bacillus thuringiensis DSM6110	99,90%	37	475	498
		D2MT5	Bacillus fusiformis ATCC7055	97,85%	37	472	497
		D2MT6	Aeromonas caviae ATCC15468	99,23%	26	147	491
		D2MT15	Bacillus thuringiensis ATCC33679	99,69%	29	449	501
	CBA/2220352261	D2MT16	Bacillus thuringiensis ATCC33679	99,99%	36	495	501
		D2MT23	Escherichia coli ATCC25922	99,87%	27	381	489
		D2MT24	Escherichia coli ATCC25922	98,59%	28	490	489
	TERGITOL/62248	D2MT22	Escherichia coli ATCC25922	98,59%	28	490	489
		D2MT32	Escherichia coli ATCC25922	99,82%	31	441	489
	CCA CHROMOG /63854	D2MT34	Escherichia coli ATCC25922	99,76%	24	412	489
D3	AGAR NUTRIT/63370	D3MT7	Bacillus thuringiensis ATCC10792	99,66%	27	457	498
		D3MT8	Aeromonas media ATCC33907	99,99%	34	493	491
		D3MT9	Bacillus thuringiensis DSM6110	99,93%	36	482	498
		D3MT17	Bacillus thuringiensis DSM6110	99,51%	28	408	498
	CBA/2220352261	D3MT18	Bacillus thuringiensis DSM6110	99,82%	32	470	498
		D3MT25	Aeromonas hydrophila hydrophila ATCC7966	99,67%	28	393	491
		D3MT26	Aeromonas veronii CECT4199	99,64%	32	493	491
	TERGITOL/62248	D3MT35	Aeromonas veronii CECT4199	98,63%	22	133	491
		D3MT36	Aeromonas jandaei ATCC49568	98,45%	23	270	491
	CCA CHROMOG /63854	D3MT37	Aeromonas caviae ATCC15468	99,84%	23	318	491
D4	AGAR NUTRIT/63370	D4MT10	Exyguobacterium acetylicum ATCC953	99,96%	34	504	507
		D4MT11	Bacillus thuringiensis DSM6091	99,85%	36	455	498
		D4MT12	Bacillus fusiformis ATCC7055	97,77%	31	455	497
		D4MT19	Bacillus thuringiensis ATCC10792	99,79%	35	477	498
	CBA/2220352261	D4MT20	Bacillus thuringiensis DSM6091	99,88%	33	499	498
		D4MT27	Citrobacter braakii ATCC51113	99,41%	30	321	489
		D4MT28	Aeromonas hydrophila hydrophila ATCC7966	99,85%	30	381	491
	TERGITOL/62248	D4MT38	Citrobacter braakii ATCC51113	99,56%	26	311	489
		D4MT39	Escherichia coli ATCC25922	99,85%	23	203	489
	CCA CHROMOG /63854	D4MT40	Escherichia coli ATCC25922	99,84%	24	213	489

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
99,55%	30	405
		% Recuperación bases
		81

Tabla 7: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras D1...D4, a su vez procedentes de la muestra D (San Sebastián de los Reyes 2). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF.	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
E1	AGAR NUTRIT/63370	E1MT1	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,87%	30	463	498
		E1MT2	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,91%	36	493	497
		E1MT3	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	35	483	498
		E1MT4	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	41	499	498
		E1MT5	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	39	488	498
	CBA/2220352261	E1MT6	Bacillus cereus ATCC 14579	99,96%	35	478	498
		E1MT7	Bacillus fusiformis ATCC 7055	85,85%	26	274	497
		E1MT8	Bacillus fusiformis ATCC 7055	98,03%	36	476	497
	TERGITOL/62248	E1MT9	Shigella boydii ATCC 8700	99,47%	26	425	489
		E1MT10	Escherichia coli ATCC 10536	99,32%	26	417	489
	CCA CHROMOG /63854	E1MT11	Acinetobacter genomospecies ATCC 17922	99,13%	34	482	484
E2	AGAR NUTRIT/63370	E2MT1	Bacillus fusiformis ATCC 7055	90,86%	27	276	497
		E2MT2	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	35	483	501
		E2MT3	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	37	483	498
		E2MT4	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	37	480	498
		E2MT5	Bacillus fusiformis ATCC 7055	89,38%	25	278	497
	CBA/2220352261	E2MT6	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	36	489	498
		E2MT7	Bacillus cereus ATCC 14579	99,98%	34	482	498
		E2MT8	Bacillus cereus ATCC 14579	99,97%	33	482	498
	TERGITOL/62248	E2MT9	Escherichia coli ATCC 10536	99,64%	34	486	489
		E2MT10	Citrobacter koseri ATCC 27028	97,60%	33	469	489
	CCA CHROMOG /63854	E2MT11	Escherichia coli ATCC 10536	99,62%	34	487	489
		E2MT12	Salmonella entericahoutenae ATCC 43974	97,61%	32	477	489
	AGAR NUTRIT/63370	E3MT1	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	36	472	501
		E3MT2	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	39	471	498
		E3MT3	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	37	483	498
		E3MT4	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,00%	37	493	497
		E3MT5	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	99,94%	35	483	501
		E3MT6	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	37	482	498
		E3MT7	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	38	483	501
		E3MT8	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	37	484	498
		E3MT9	Enterobacter cloacae dissolvens ATCC 23373	99,62%	34	484	487
		E3MT10	Escherichia coli ATCC 10536	99,72%	34	463	489
E4	AGAR NUTRIT/63370	E4MT1	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	99,84%	37	475	501
		E4MT2	Bacillus fusiformis ATCC 7055	91,75%	27	280	497
		E4MT3	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	38	487	498
		E4MT4	Brevibacillus parabrevis ATCC 10027	99,90%	34	474	484
		E4MT5	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,90%	36	496	497
	CBA/2220352261	E4MT6	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,90%	37	499	498
		E4MT7	Bacillus cereus ATCC 14579	100,00%	40	475	498
		E4MT8	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,89%	38	482	498
	CCA CHROMOG /63854	E4MT9	Citrobacter koseri ATCC 27028	97,76%	32	490	489
		E4MT10	Escherichia coli ATCC 10536	99,64%	35	486	489

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
98,56%	34	460
		% Recuperación bases
		92

Tabla 8: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras E1...E4, a su vez procedentes de la muestra E (Valdemoro). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

SUBMUESTRA	MEDIO CULTIVO/LOTE	ESPÉCIMEN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIF.	Control calidad (SCORE)	Nº BASES SEC. CONSENSO	Nº BASES SEC. REFERENCIA
F1	AGAR NUTRIT/63370	F1MT1	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	34	477	498
		F1MT2	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	33	494	498
		F1MT3	Bacillus fusiformis ATCC 7055	98,02%	29	451	497
		F1MT4	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,87%	34	492	498
		F1MT5	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,97%	34	480	498
	CBA/2220352261	F1MT6	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,26%	26	417	498
		F1MT7	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	35	473	498
		F1MT8	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	33	473	498
	TERGITOL/62248	F1MT11	Enterobacter hormaechei ATCC 49162	99,53%	31	400	489
	CCA CHROMOG /63854	F1MT9	Escherichia coli FSIS NA	99,91%	32	486	489
F1MT10		Escherichia coli FSIS NA	99,96%	29	446	489	
F2	AGAR NUTRIT/63370	F2MT1	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	35	482	498
		F2MT2	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,77%	25	480	497
		F2MT3	Enterobacter cloacae dissolvens ATCC 23373	99,68%	31	484	487
		F2MT4	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,73%	27	421	497
		F2MT5	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	35	477	498
	CBA/2220352261	F2MT6	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,06%	34	487	497
		F2MT7	Bacillus thuringiensis DSM 6110	99,79%	32	474	498
		F2MT8	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,90%	36	452	497
	TERGITOL/62248	F2MT11	Escherichia coli ATCC 2918	99,96%	29	453	489
	CCA CHROMOG /63854	F2MT9	Escherichia coli FSIS NA	99,66%	28	461	489
F2MT10		Escherichia fergusonii ATCC 35469	99,99%	30	373	489	



F3	AGAR NUTRIT/63370	F3MT1	Bacillus thuringiensis DSM 6091	99,86%	38	496	498
		F3MT2	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,97%	36	493	497
		F3MT3	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,30%	31	464	497
		F3MT4	Bacillus fusiformis ATCC 7055	97,94%	34	477	497
	CBA/2220352261	F3MT5	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	99,94%	34	470	498
		F3MT6	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,02%	33	467	497
		F3MT7	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	99,87%	31	475	501
		F3MT8	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,08%	35	473	497
	TERGITOL/62248	F3MT11	Escherichia coli FSIS NA	99,97%	24	413	489
		F3MT9	Escherichia coli FSIS NA	99,54%	31	438	489
F4	CCA CHROMOG /63854	F3MT10	Escherichia coli FSIS NA	99,91%	30	452	489
		F4MT1	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,94%	35	481	497
		F4MT2	Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	100,00%	34	482	484
		F4MT3	Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,01%	35	469	497
	AGAR NUTRIT/63370	F4MT4	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	36	483	498
		F4MT5	36 Bacillus sphaericus ATCC 14577	98,12%	36	489	497
		F4MT6	Bacillus sphaericus ATCC 14577	97,95%	33	457	497
		F4MT7	Bacillus thuringiensis ATCC 33679	100,00%	35	465	501
	CBA/2220352261	F4MT8	Bacillus thuringiensis ATCC 10792	100,00%	36	460	498
		F4MT11	Escherichia coli FSIS NA	99,89%	29	445	489
	TERGITOL/62248	F4MT9	Escherichia coli FSIS NA	99,81%	28	443	489
		F4MT10	Escherichia coli FSIS NA	99,81%	30	446	489

% identificación	Exactitud/Score	Tamaño medio secuencia
99,27%	32	463
		% Recuperación bases
		93

Tabla 9: Resultados genéticos obtenidos a partir de aislados bacterianos procedentes de las submuestras F1...F4, a su vez procedentes de la muestra F (Valdemoro2). El método de identificación empleado fue el descrito en IT-M-212. Los diferentes indicadores de calidad se han descrito en el apartado 4.4.10

5.2.2. Cotejo estadístico de las secuencias genéticas procedentes de las muestras de suelo

Con los resultados obtenidos a partir de los análisis genéticos del ADN_r16S procedente de los aislados estudiados se procedió a realizar el cotejo estadístico filogenético molecular de las secuencias de rDNA_{16S} consenso obtenidas. El objetivo era relacionar cada submuestra con su muestra original y diferenciar cada submuestra de otras muestras iniciales o muestras madre de suelo, lo que confiere al cotejo interés criminalístico.

La sistemática y la evolución molecular engloban un conjunto amplio de herramientas y modelos bioestadísticos que permiten estudiar el registro evolutivo escrito en el material hereditario (DNA) y en sus productos, con el fin de poder hacer inferencias sobre las relaciones ancestro-descendiente (filogenéticas) de dominios de proteínas, genes y organismos.

Dichos estudios filogenéticos permiten crear árboles que muestran las relaciones entre ancestros y descendientes, así como las distancias evolutivas gracias a la longitud de las ramas de dicho árbol. La reconstrucción de un árbol que refleja la historia evolutiva de un conjunto de especies es una tarea difícil, y requiere un gran cuidado a la hora de elegir los datos que van a utilizarse.

Una opción ideal es una región genómica que aparece exactamente una vez en cada especie y cuya historia evolutiva es “idéntica” a la de las especies. La tasa de cambio en la región debería ser lo suficientemente rápida para distinguir entre especies estrechamente relacionadas, pero no demasiado rápida para que las regiones de especies muy alejadas puedan ser alineadas de manera fiable.

La secuencia de ADN que codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas (llamada ARN 16S en bacterias) se ha encontrado como uno de los mejores segmentos genómicos para este tipo de análisis, a pesar de que existen varias copias del mismo en algunos genomas.

El estudio estadístico filogenético (parentesco) y comparativo de las secuencias genéticas de los microorganismos identificados para realización de cotejo, obtenidas de cada aislado bacteriano fueron alineadas y ensambladas con el Software Microseq ID Manager © para obtener así las secuencias consenso de cada una de

ellas. Las secuencias consenso fueron comparadas usando el programa MEGA 5.0.1© utilizando como base de múltiple alineamiento el programa CLUSTAL 1.6© con los siguientes **parámetros**⁵⁸:

- Negative matrix: Off
- Cutoff: 70%
- Penalizaciones por “gaps” (ambos tipos): 0,7

⁵⁸ **Toda la información que se expone a continuación respecto a los parámetros y modelos utilizados vienen descritos en manual MEGA 6©** (<http://www.megasoftware.net/docs>)

A pesar de su antigüedad, el método CLUSTALW, sigue contando con características favorables como: la ponderación, la precisión en el alineamiento de secuencias, la facilidad de su uso y la velocidad de análisis.

Parámetro CLUSTALW 1.6 En el parámetro CLUSTALW 1.6, no hay límite en la longitud de las secuencias a estudiar, y es factible para trabajar con secuencias diferentes y complejas, cubriendo los “gaps”. Además, esta matriz aumenta la precisión de transición de la secuencia de 0 a 1, lo que es una mejora respecto a la versión anterior, ya que esta solo permitía activar o desactivar esta función.

GAP Opening penalty. Es un parámetro cuya finalidad es acercar el estudio de secuencias que han perdido o ganado bases, lo máximo posible a la realidad biológica. Para ello, cuando el programa lleva a cabo el alineamiento incluye o elimina un espacio, es decir, realiza una acción que puede ser puntuada favorable o negativamente, lo que se conoce como penalización. Si cuando regulamos el parámetro de Gap Open le damos un valor alto, se evitará la inclusión de un gran número de espacios, lo que resulta positivo cuando se intentan alinear dos secuencias que son semejantes. Sin embargo, para secuencias no relacionadas, lo ideal es configurar penalizaciones bajas para facilitar el alineamiento entre ellas.

GAP Extension penalty. Este parámetro adjudica una penalización por aumentar el tamaño de una espacio ya existente durante la alineación de una secuencia. Aumentar el valor de la penalización hará que los espacios internos sean más cortos sin penalizar los espacios terminales. Lo que se busca con un alineamiento óptimo es reducir al mínimo los GAPS y maximizar las coincidencias, en caso de que las secuencias no sean semejantes.

CUT-OFF. En este caso, se asigna un valor porcentual y, las secuencias incluidas dentro de este valor, serán aquellas que estén más estrechamente relacionadas, por lo que se alinearán primero. De esta manera, este parámetro retrasa la alineación de las secuencias más distantes entre sí. Este ajuste muestra el porcentaje de similitud requerido para la alineación de secuencias con un alto nivel de semejanza y retrasa el alineamiento de las que no alcancen ese porcentaje. **Nosotros usamos un 70%** ya que asumimos que estamos ante secuencias muy estrechamente relacionadas entre sí, de este modo, las más divergentes quedarán relegadas al alineamiento final.

Métodos de construcción: Neighbour-joining, Maximum-Likelihood, Minimum Evolution. El programa Mega proporciona la posibilidad de crear árboles filogenéticos empleando tres modelos: Neighbour- Joining (NJ), Maximum- Likelihood (ML) y Minimum Evolution (ME). Estos se encuentran incluidos dentro de dos grandes grupos; por un lado, el conocido como “exhaustive-search”, al que pertenece el modelo ML, y por otro, el “stepwise-clustering” al que pertenecen los grupos NJ y ME.

Los dos grandes grupos siguen distintas metodologías claramente diferenciables para la creación del árbol filogenético final. De este modo, el “exhaustive- search” crea un gran número de árboles filogenéticos y escoge, entre todos ellos, el que considera más óptimo en función de unos criterios predeterminados. Sin embargo, el “stepwise-clustering” examina y compara secuencias buscando relaciones locales entre ellas, para construir el árbol paso por paso, a medida que se lleva a cabo este cotejo.

Los modelos de **NJ y ME ofrecen un alto rendimiento** a la hora de proporcionar el árbol correcto ya que se obtienen elevados intervalos de confianza en los casos en los que los ratios de sustitución son constantes. El método ML es un método más complejo y proporciona un rendimiento ligeramente superior a los dos anteriores, siendo mejor para los casos en los que se asume una velocidad del ratio de sustitución variable entre las distintas ramas del árbol filogenético. Debido a la diferente complejidad mencionada anteriormente, el NJ es un método eficaz y más sencillo, por lo que el tiempo computacional es menor. Esto hace que el NJ sea de gran utilidad para secuencias de menor complejidad, por lo que será el método que utilizaremos en este caso.

Método de validación Bootstrap. Como se ha expuesto anteriormente, el método escogido para la construcción del árbol filogenético ha sido el NJ. El número de réplicas que se recomienda para el método de validación ha ido incrementado a medida que ha crecido el poder computacional disponible. Se ha visto que para métodos pesados y complejos como el ML un número de 50 réplicas es suficiente para dar unos valores de apoyo mayores del 95%. Sin embargo, para un método de menor carga computacional como es NJ, un valor mayor de réplicas puede ser asequible además deseable. **Usando el método NJ, Efron (1987) ha demostrado que aplicando un bootstrapping 1000 obtenemos un intervalo mínimo de alrededor del 96% (Blair Hedges, 1991).**

Modelos de nucleótidos Las secuencias de ADN están formadas por cuatro bases. La probabilidad de que una base , i, cambie a una base ,j, depende del tiempo que haya pasado, por lo que se trabaja con ratios. Estos ratios, además de otros parámetros que se pueden tener en cuenta, permiten estimar la distancia evolutiva. De entre los modelos que propone el programa MEGA para el NJ **se eligió el Kimura 2 parámetros** para poder calcular las distancias entre pares de secuencias. Los métodos evolutivos en filogenias moleculares describen el modo y la probabilidad de que una secuencia de nucleótidos cambie a otra secuencia homóloga a lo largo del tiempo. Es decir, estos modelos evolutivos describen la probabilidad de que se produzca el cambio de un nucleótido a otro, a lo largo de las ramas de un árbol filogenético. Dichos modelos de evolución de nucleótidos se definen matemáticamente mediante dos clases de parámetros que determinan el cambio:

1. La frecuencia de cada nucleótido. Parámetro que mide la frecuencia de los nucleótidos en la matriz de datos.
2. El tipo de sustituciones y sus correspondientes tasas de sustitución.

Los modelos más sencillos asumen una misma tasa relativa para todas las sustituciones posibles, mientras que los más complicados asumen una tasa relativa diferente para cada tipo de sustitución. Hemos elegido el modelo **paramétrico Kimura 2**, puesto que la frecuencia de aparición de los cuatro nucleótidos (A, C, G y T) es la misma y se da la existencia de dos tipos de sustituciones (transversión y transición) generando diferencias en las tasas de sustitución, por lo que el modelo tiene como parámetros el número de ramas que constituyen el árbol más uno, obteniendo un error muestral bajo.

Para el análisis estadístico de parentesco y creación de árboles genealógicos se utilizó el programa **MEGA 5.0.1**.[®] El **método estadístico** utilizado para la evaluación fue el de **Neighbor-Joining** que no asume la existencia de un reloj evolutivo y se obtienen árboles sin raíz.

Está basado en el principio de mínima evolución y puede incorporar distintas tasas de evolución en diferentes linajes. Si en este método se añade una secuencia perteneciente a un grupo taxonómico distinto (outgroup), se puede averiguar el lugar de enraizamiento apropiado.

El método de rutina para la asignación de límites de confianza de los diferentes puntos de ramificación en los árboles obtenidos, fue el análisis por **bootstrapping** o reestimación del árbol mediante la variación en la posición y la repetición de caracteres de la secuencia.

Para el cálculo de distancias evolutivas, dentro de cada método, se pueden elegir varias opciones. Por analogía con los trabajos de FIERER⁵⁹ respecto a la microbiota de piel humana, **dentro del método de Neighbor Joining se utilizó el modelo de Kimura-2 parámetros**.

5.2.3. Criterios de evaluación

Antes de reflejar los resultados obtenidos se indican los criterios seguidos para la evaluación y conclusiones finales de este trabajo:

- A. **Criterio 1.** Se excluyen del cotejo las identificaciones no coincidentes. En las muestras se obtuvieron identificaciones coincidentes y no coincidentes, lo cual no quiere decir más que el aislamiento de microorganismos tiene sus limitaciones derivadas del cultivo en laboratorio. Se cotejaron los aislados coincidentes.
- B. **Criterio 2.** Por dar lugar a errores de interpretación, cuando se coteja un aislado bacteriano de una especie con aislados identificados de la misma especie, procedente de una muestra diferente, se fuerza la estadística como positiva. Por lo tanto se cotejaron en relación aproximada 1:1 (tres coincidentes de una muestra con 3-4 de otra muestra y así sucesivamente).
- C. **Criterio 3.** Cuando se cotejan, dentro de un grupo de especímenes pertenecientes a diferentes géneros bacterianos, un identificado de una muestra con un aislado bacteriano identificado genéticamente como perteneciente a la misma especie de otra muestra, en el contexto general tendremos una tendencia con probabilidad del 50% de que el cotejo sea positivo. En este estudio se obtienen resultados aceptables empleando mínimo 3 especímenes coincidentes intermuestras⁶⁰.
- D. **Criterio 4:** Los cotejos efectuados indican que los valores de probabilidad obtenidos no deben ser inferiores al 80%. Sin embargo, se pueden considerar valores de probabilidad superiores al 60% en los nodos externos que se obtienen en la comparativa de un grupo, siempre que el nodo inmediatamente anterior sea superior al 80% (esto ocurre por formación de subgrupos de relación dentro de un mismo grupo idéntico y deriva de las pequeñas diferencias de calidad y número de bases). Para evaluar esta circunstancia se debe valorar el árbol obtenido antes de establecer el árbol consenso.
- E. **Criterio 5:** El criterio de distancia se obvió con probabilidades superiores al 85%. Los valores exactamente iguales, con independencia del signo, indican un cotejo positivo. También se pueden considerar los valores divergentes que no sean iguales (comparando la última cifra significativa, por ejemplo: 0.000001 y 0.000002).

Los valores divergentes se pueden obtener en cotejos positivos con probabilidades inferiores a 80% y superiores al 60%, pero en este caso será un criterio complementario que seguiremos únicamente en los nodos externos que previamente sean precedidos de nodos con probabilidades superiores al 80%.

⁵⁹ FIERER N.;LAUBER, C.; ZHOU,N.; MCDONALD, D.; COSTELLO, E.; KNIGHT,R. "Forensic identification using skin bacterial communities" en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, n. 14 , April 6, 2010. Disponible en www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107

⁶⁰ Debemos recomendar, empleando este tipo de cotejo 5 secuencias coincidentes. Más adelante se expondrá una forma más práctica y fiable de utilizar los haplotipos obtenidos para cotejo.

5.2.4. Tipologías de los resultados obtenidos en el cotejo de las secuencias genéticas

5.2.4.1. Tipología I

Cotejo de las submuestras obtenidas a partir de una misma muestra. El resultado obtenido a priori debía consistir en que no fueran distinguibles, es decir, que presenten probabilidades altas, distancias de las ramas iguales o muy similares.

El error predominante que debe considerarse en esta tipología es el falso negativo. Aplicando los modelos estadísticos y criterios establecidos en los apartados 5.2.2 y 5.2.3, respectivamente, se obtuvieron los **siguientes resultados**:

1. Muestras A: cotejo positivo (20 de 20) especímenes.
2. Muestras B: cotejo positivo (17 de 17) especímenes.
3. Muestras C: cotejo positivo (7 de 10) especímenes. Tres se evaluarían como falso negativos (no concluyentes).
4. Muestras D: cotejo positivo (11 de 15) especímenes. Cuatro se evaluarían como falso negativos (no concluyentes).
5. Muestras E: cotejo positivo (25 de 25) especímenes.
6. Muestras F: cotejo positivo (19 de 19) especímenes.

5.2.4.2. Discusión de resultados Tipología I

En total se evaluaron 106 especímenes, con un número de 7 falsos negativos, lo que supone un 6,5% del total de considerar todos los especímenes evaluados. En este resumen no se han considerado los especímenes de *Bacillus sphaericus*-*Bacillus fusiformis*, por presentar un porcentaje de similitud < 99% y demostrarse posteriormente que esa situación fue determinante en la obtención de falsos positivos con esta especie concreta.

5.2.4.3. Tipología II

Cotejo de las submuestras procedentes de muestras diferentes. El resultado obtenido a priori debía consistir en que fueran distinguibles y no relacionables. El error predominante que debe considerarse en esta tipología es el **falso positivo**.

Este cotejo se realizó por tandas: una primera tanda (**Tabla 10**) consistió en el cotejo estadístico de especímenes coincidentes obtenidos de todas las submuestras A, B y C (12 submuestras).

En la segunda tanda (**Tabla 11**) se procedió análogamente con los obtenidos en las D, E y F (12 submuestras). Una tercera tanda (**Tabla 12**) consistió en el cotejo de especímenes coincidentes de todas (24) las submuestras A,B,C,D,E,F.

El cotejo de todas las secuencias se ejecutó utilizando los modelos estadísticos explicados en el apartado 5.2.2 y que se detallarán al pie de las tablas (10, 11 y 12) que se expondrán a continuación, en las que se presentan los árboles filogenéticos obtenidos para cada una de las tandas descritas.

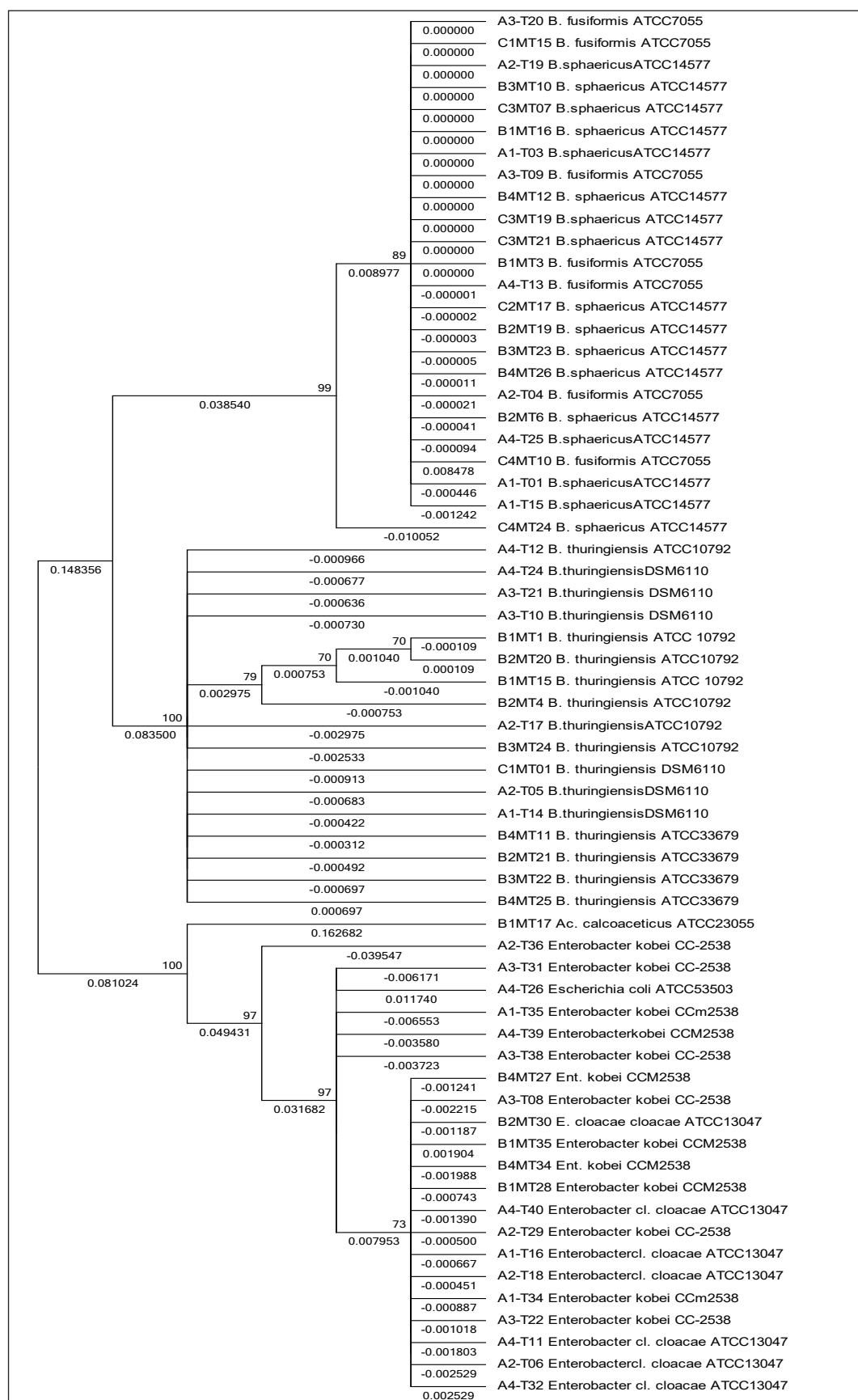


Tabla 10: Cotejo estadístico de especímenes coincidentes obtenidos de las submuestras A, B y C (12 submuestras). Para el análisis estadístico de parentesco y creación de árboles genealógicos se utilizó el programa MEGA 5.0.1. ®. El método estadístico utilizado para la evaluación fue *Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parámetros, con Bootstrapping 1000*. Cotejo correcto (33 de 40) especímenes. Cuatro se evaluaron como falso positivo y tres como falso negativo.



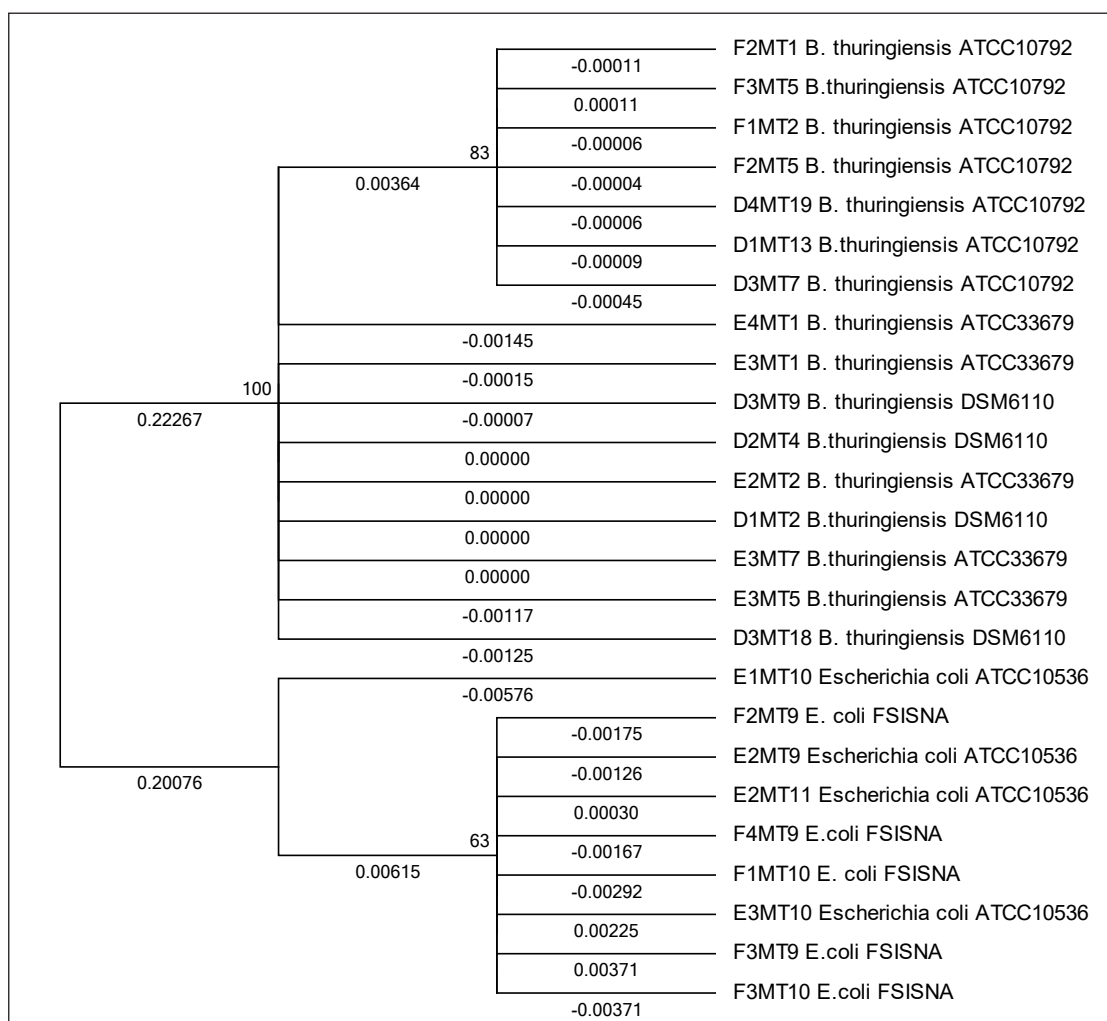


Tabla 12: Cotejo estadístico de especímenes coincidentes obtenidos de las submuestras A, B, C, D, E y F (24 submuestras).
 Para el análisis estadístico de parentesco y creación de árboles genealógicos se utilizó el programa MEGA 5.0.1.®.
 El método estadístico utilizado para la evaluación fue *Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parámetros, con Bootstrapping 1000*. Cotejo correcto (24 de 27) especímenes.

Aplicando tanto los criterios establecidos en 5.2.3 y la metodología estadística descrita (Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parámetros, con Bootstrapping 1000) se obtuvieron los siguientes resultados para la Tipología II, consistente en el cotejo de las submuestras procedentes de muestras diferentes:

1. Muestras A, B, C (tabla 10): cotejo correcto (33 de 40) especímenes. Cuatro se evaluaron como falso positivo y tres como falso negativo. Pero hemos de hacer una consideración, las muestras A y B distan entre sí 20 metros, por lo que no se van a considerar los falsos positivos A-B. Por lo tanto el balance es un falso positivo y cuatro falsos negativos.
2. Muestras D, E, F (tabla 11): cotejo correcto (68 de 75) especímenes. Cuatro se evaluaron como falso positivos y tres como falso negativos.
3. Muestras A, B, C, D, E, F (tabla 12): cotejo correcto (24 de 27) especímenes. Tres no se posicionan con la muestra que le corresponde (falsos positivos).

5.2.4.4. Discusión de resultados obtenidos en Tipología II

En total se evaluaron 142 especímenes, con un número de 8 falsos positivos y 7 falsos negativos, lo que supone un 10,5 % del total de considerar todos los especímenes evaluados.

En este resumen no se han considerado los especímenes de *Bacillus sphaericus*- *Bacillus fusiformis*, por presentar porcentajes de coincidencia inferiores al 99% y demostrarse posteriormente que esa situación fue determinante en la obtención de falsos positivos con esta especie concreta. Tampoco se han considerado los cotejos de un solo espécimen contra otro (criterio 3, apartado 5.2.2).

5.2.5. Discusión final de resultados obtenidos en el cotejo realizado

El estudio estadístico efectuado lleva a establecer que, aplicando conjuntamente los errores correspondientes a las tipologías I y II descritas, se obtiene una probabilidad global de acierto que se estima en el 90%. Se contrastaron errores asumibles en torno al 10%, considerándose que el método es idóneo.

Algunas cuestiones derivadas de este estudio estadístico se consideran significativas y se transcriben a continuación:

1. No se deben utilizar secuencias que no cumplan los parámetros internos de calidad del método en cuanto a secuenciación genética. Esta validación evidencia que los controles que se asignan a la identificación deben ser extrapolados al cotejo de las secuencias. Evidentemente hay una relación entre calidad/cantidad de bases y relaciones filogenéticas. De ahí que descartamos especies que el equipo identificaba con porcentajes inferiores al 99%.⁶¹
2. El verdadero factor limitante del cotejo es el número de especímenes a cotejar por grupo. No seguir este criterio y resto de criterios de alineamiento y parámetros establecidos puede inducir a error estadístico. Pueden efectuarse comparaciones intraespecíficas dentro de un grupo con un mínimo de especímenes a cotejar, que se establece en 10.
3. Al tratarse de muestras de origen conocido debe tomarse el resultado de la evaluación estadística con prudencia, siguiendo con el modo de resolución multidisciplinar de informes, es decir, apoyándose en otras técnicas de uso habitual en Criminalística, como es el estudio Geoquímico de suelos.
4. La mejora de las herramientas estadísticas para la comparación de secuencias genéticas conllevará análogamente una mayor resolución y fiabilidad de los resultados.

6. ESTANDARIZACIÓN INTERNACIONAL DEL ANÁLISIS GENÉTICO BACTERIANO EN SUELOS MEDIANTE METODOLOGÍA T-RFLP. PROYECTO MISAFE

Con los métodos y avances tecnológicos actuales se ha de considerar a la Microbiología como ciencia aplicable a la investigación Criminalística. En aras de una mejor caracterización de las muestras y una mayor contribución al peso de la prueba pericial en el proceso penal, se abordó dicho estudio considerando que con los medios técnicos actuales se pueden aislar, identificar y caracterizar, morfológica, genética y bioquímicamente, las cepas bacterianas que constituyen las comunidades microbianas del suelo, pudiéndose además establecer relaciones comparativas mediante la filogenia molecular⁶².

El estudio criminalístico de suelos debe ser multidisciplinar y en nuestro laboratorio dicho estudio se realiza desde varios puntos de vista, aunque esencialmente microbiológico (genética bacteriana) y geoquímico, para una mejor caracterización y comparación de las distintas muestras de suelo, siendo ésta la tendencia actual en el ámbito forense-criminalístico de suelos.

Los trabajos de investigación, aplicados a casos reales, poco a poco fueron obteniendo resultados que difundir a las instancias e institutos de investigación criminal, tanto a nivel europeo como a nivel nacional. Estos trabajos ya han sido reconocidos en algunas sentencias de interés, como la que se cita a continuación:

“También resulta de especial interés otro informe pericial, siempre del Departamento de Química del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil (tomo VIII, folios 1725 a 1735) y que también fue ratificado en

⁶¹ Posteriormente se verá la nueva metodología de empleo de haplotipos para una mayor fiabilidad del cotejo.

⁶² CORDERO PÉREZ, J.C.: “Análisis criminalístico de suelos (I). La aportación de la microbiología a la prueba pericial”...Op. cit., págs. 35 a 37.

el plenario, según el cual la muestra de tierra tomada en el huerto que el procesado posee, y más en concreto tomada cerca de una hormigonera, presentaba la misma composición mineralógica y química, así como similar granulometría, que las muestras de tierra extraídas de los sacos atados al cadáver y de otro saco hallado en una de las casetas del mismo huerto, perteneciendo además a la misma población microbiana los aislados obtenidos en las muestras de tierra extraídas del lugar cercano al cadáver y de las proximidades de la hormigonera, así como los aislados obtenidos en las muestras de tierra extraídas de un saco encontrado en una de las casetas del huerto y en el interior del vehículo todoterreno de la marca xxxxx perteneciente al procesado, y lo mismo sucede con los aislados obtenidos en las muestras de tierra extraídas del saco de la caseta y del atado al cadáver, detallándose en el informe pericial como los aislados de cada una de las distintas clases pertenecen, tras el correspondiente análisis filogenético molecular, a la misma cepa y comunidad microbianas.”

Este caso fue estudiado en el año 2008. En el año 2010 nace un Grupo de Trabajo que recogía este tipo de técnicas analíticas a nivel europeo. Así, en Marzo de ese año, en Wiesbaden (Alemania), se constituyó el Grupo “Animal, Plants and Soil Traces” (APST) en el que tuvieron cabida los especialistas europeos en los estudios de suelos, pero también especialistas en otros campos de especial interés policial (por ejemplo genética animal y vegetal para investigación y lucha contra el tráfico de especies protegidas por el convenio CITES.)

Todos los trabajos de investigación efectuados hasta noviembre de 2012, sin embargo, seguían siendo insuficientes para poder sentar las bases de esta nueva disciplina en el ámbito criminalístico.

Paralelamente, en el año 2011 se inició un proyecto de investigación en el seno de la Unión Europea. Dicho proyecto tenía como base el empleo de herramientas genéticas de nueva generación, así como la mejora del análisis T-RFLP, empleado en análisis forense. El empleo del análisis T-RFLP de forma conjunta con estudio de las secuencias genéticas de aislados bacterianos se preveía como una forma eficaz de comparar resultados sin depender de otras disciplinas, lo cual no quiere decir que hubiera necesariamente que prescindir de las mismas. Se trataba del proyecto MiSAFE (*The Development and Validation of Microbial Soil Community Analyses for Forensics Purposes*)

Los objetivos específicos del proyecto, algunos de ellos en consonancia con los objetivos de esta Tesis, como ya se mencionó en apartados anteriores eran:

1. Desarrollar herramientas adecuadas para el muestreo, almacenaje y procesamiento del DNA de suelos para aplicación en ciencia forense.
2. Aplicar y delimitar el uso de tecnologías basadas en el DNA en la ciencia forense de suelos para investigación y como prueba judicial.
3. Desarrollo y aplicación de software de análisis de datos como herramienta forense de suelos.
4. Validar y consolidar legalmente el uso de la microbiología forense de suelos en los sistemas legales europeos.
5. Proveer de estándares básicos y procedimientos para la creación de una base de datos microbiológica de suelos europea.

6.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA T-RFLP DE MICROORGANISMOS DEL SUELO PARA APLICACIÓN FORENSE⁶³

Este apartado es fruto de la propuesta previa realizada por los grupos de investigación que integran MiSAFE, entre los que se encuentra el equipo de genética no humana del laboratorio de Guardia Civil, con objeto de estandarizar los procedimientos operativos de los parámetros técnicos, relativos a la genética bacteriana en suelos, para su aplicación en el ámbito criminalístico y forense.

Incluye las condiciones de toma y conservación de las muestras y se basará en los estándares de la norma ISO 17025, así como en los resultados de un análisis intercomparativo de muestras de tierra proporcionados por distintos grupos del proyecto.

⁶³ El desarrollo experimental se realizó siguiendo los protocolos diseñados durante el proyecto europeo MiSAFE FP7-SEC-2012-313149.

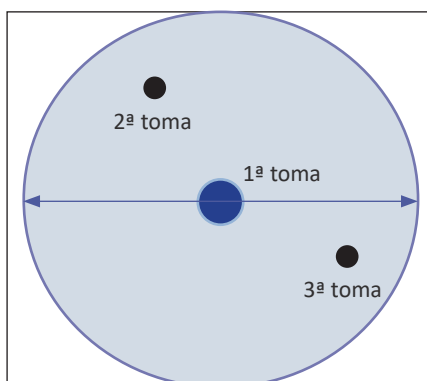
6.1.1. Obtención de los T-RFLP de ADN bacteriano de suelo

El método utilizado para la extracción de ADN de muestras control de tierra, y su análisis mediante T-RFLP, se desarrolló de forma correcta utilizando la tecnología propuesta por los grupos de investigación que integran MiSAFE, permitiendo la caracterización de distintas muestras de tierra (huella de t-RFLP) y observándose diferencias significativas entre las mismas.

6.1.1.1. Muestras y Protocolo empleados

Se describen en el **ANEXO A**. Se emplearon las siguientes muestras:

- Muestras de suelo procedentes de un test intercomparativo internacional (SA, SB, S1, S2, S3).
- Suelos de Escocia: Rathen, Rothansted, Daumlithie, Ardallie, Hutton.
- Suelos de Guyana.
- Suelos de Israel.
- Suelos de España. En el caso de la toma de muestras españolas se siguieron las siguientes instrucciones:
 - ▷ Localizar vía GPS las coordenadas del lugar donde se toman las muestras (utilizar la aplicación Maps, localización, pulsar en la parte inferior donde aparecen coordenadas).
 - ▷ Fotografiar el lugar de la toma de muestras (nos valen las del teléfono).
 - ▷ Retirar los restos orgánicos (vegetación, etc...) presente sobre la superficie. Utilizar la pala limpia.
 - ▷ Coger la tierra superficial con la pala no sobrepasando los primeros 5 centímetros de profundidad. Abrir los botes de plástico en el momento de introducir la tierra. Llenar el bote de plástico de tierra.
 - ▷ Tomar otras dos muestras del mismo modo (tres en total) a una distancia de entre 10 y 100 metros de la toma inicial.



6.1.1.2. Metodología

Se desarrolla en el **ANEXO A**. A modo de resumen:

Extracción de DNA

Se ha utilizado el kit PowerSoil® DNA IsolationKit (Ref. 12888, MO BIO Laboratories, INC.) para la extracción del DNA cromosómico total de las muestras de suelo.

Concentración y limpieza del ADN

Para concentrar y limpiar las extracciones de DNA genómico, se ha utilizado el kit “DNA Clean&Concentrator™ -25” (Ref. D4006; ZymoResearch).

PCR con marcadores fluorescentes

Se han utilizado los cebadores 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y el 907R (5'-CCGTCAATTC-MTTTTRAGTTT-3'), marcados ambos con 6FAM en 3'.

Digestión de ADN de cadena sencilla o doble cadena protuberante procedente de la PCR.

Reactivos y materiales:

- Mung Bean Nuclease (New England BioLabs, Ref. M0250S).
- 0,6 µl de MugBeanEnzyme. Cada reacción requiere 10 U/µl.
- 4 µl de tampón de reacción (10X nuclease reaction buffer).
- 36 µl de agua bidestilada.
- 40 µl PCR.
- SDS al 10 % estéril.

Digestión de productos de la PCR

- Nuclease TaqαI – 20 U/ µl (New England BioLabs, Ref. R0149S)

Nueva limpieza y cuantificación del DNA

DNA Clean&Concentrator™ -25 (Ref. D4006; Zymo Research) siendo necesario el uso.

Electroforesis Capilar y Lectura

Realizado en la unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá (CAI Medicina y Biología).

6.1.2. Resultados

Los resultados de los distintos suelos se muestran en anexos, siguiendo el orden que se muestra a continuación:

- Suelos SA, SB,S1, S2,S3 (**Anexo B**)
- Suelos Ardallie, Rathen, Rothansted, Daumlithie, Hutton (**Anexo C**)
- Suelos Guyana (**Anexo D**)
- Suelos Israel (**Anexo E**)
- Suelos España (**Anexo F**)

6.2. VALIDACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PROTOCOLOS DE T-RFLP Y SECUENCIACIÓN GENÉTICA DE MORFOTIPOS PARA APLICACIÓN FORENSE MEDIANTE UN TEST INTERCOMPARATIVO

Los resultados se han obtenido siguiendo el protocolo descrito (ver anexo A) y por los grupos que conforman el proyecto MiSAFE para T-RFLPs (ver anexos B-F). En este apartado también se verá cómo este método permitió realizar un análisis estadístico en un ensayo intercomparativo de muestras, obteniendo los resultados esperados, lo que confirmó la bondad del procedimiento. Los resultados fueron, a su vez, confirmados mediante un análisis de morfotipos bacterianos (IT-M-212) en las mismas muestras. En el estudio estadístico se emplearon los índices Euclideo y Bray-Curtis. En relación al índice de Bray-Curtis, se utilizó la clasificación de QUAARK y KUIPER⁶⁴: <0.25 significa un origen común, > 0.42 significa un origen diferente, y un índice entre 0.25 y 0.42 es de origen incierto.

⁶⁴ QUAARK, F.C.A., KUIPER, I. "Statistical data analysis of bacterial T-RFLP profiles in forensic soil comparisons." Forensic Science International n° 210, 2011, págs. 96 a 101.

6.2.1. Test intercomparativo: correlación entre morfotipos de las muestras "Control soil samples S1, S2, S3, SA y SB"

6.2.1.1. Estudios genéticos de los morfotipos bacterianos en muestras de suelos

Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a lo descrito en el ANEXO A y que básicamente se corresponde con el análisis genético del ADN_r 16S a partir de aislados bacterianos, descrito en este Capítulo I (IT-M-212).

6.2.1.2. Análisis estadístico de las secuencias de los ADN_r 16S de los distintos morfotipos bacterianos aislados de muestras control de tierra

Basándose en las secuencias obtenidas de los diferentes morfotipos de todas las muestras se establecieron 9 haplotipos diferentes:

Haplotipo 1: A.1.1, A.1.2, A.1.3, 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3

Haplotipo 2: A.3.1, B.2.1, B.2.2, B.2.3, 1.4.1, 1.4.2

Haplotipo 3: A.2.1, B.3.1, B.3.2, 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 3.1.1, 3.1.3

Haplotipo 4: A.4.1

Haplotipo 5: A.7.1, A.7.2

Haplotipo 6: A.6.1, A.6.2, B.1.1, B.1.2, B.1.3, 1.2.1, 1.2.2, 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3

Haplotipo 7: B.4.1, B.4.2, B.4.3, 1.5.1, 1.5.2, 1.5.3, 3.1.2, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3

Haplotipo 8: 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3

Haplotipo 9: 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3

Suelo	HAPLOTIPO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Suelo control A	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Suelo control B	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Suelo control 1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Suelo control 2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Suelo control 3	0	1	1	0	0	0	1	0	1

La matriz binaria (que se muestra en la tabla 13 anterior) se generó tras un análisis multidimensional (PROXCAL), utilizando distancias euclídeas, así como un análisis de grupos usando IBM SPSS Statistics v21 para determinar la similaridad entre los perfiles.

6.2.1.3. Resultados del análisis estadístico de los morfotipos (IT-M-212)

De acuerdo con los resultados obtenidos tanto en el análisis de grupo SPSS como el multidimensional PROXCAL (ver Figuras 1 y 2), el "suelo control B" está muy cercano a "suelo control 1" y "suelo control 3", mientras que "suelo control A" podría erróneamente no ser considerada como cercano a ninguna de las muestras analizadas, aunque la realidad muestra que está muy cercano a "suelo control 1". Para el suelo control 2 claramente descartamos relación alguna con A o B. Estos resultados mostraron una muy baja desviación típica (0,01156) y coeficiente de Tucker (0,99950).

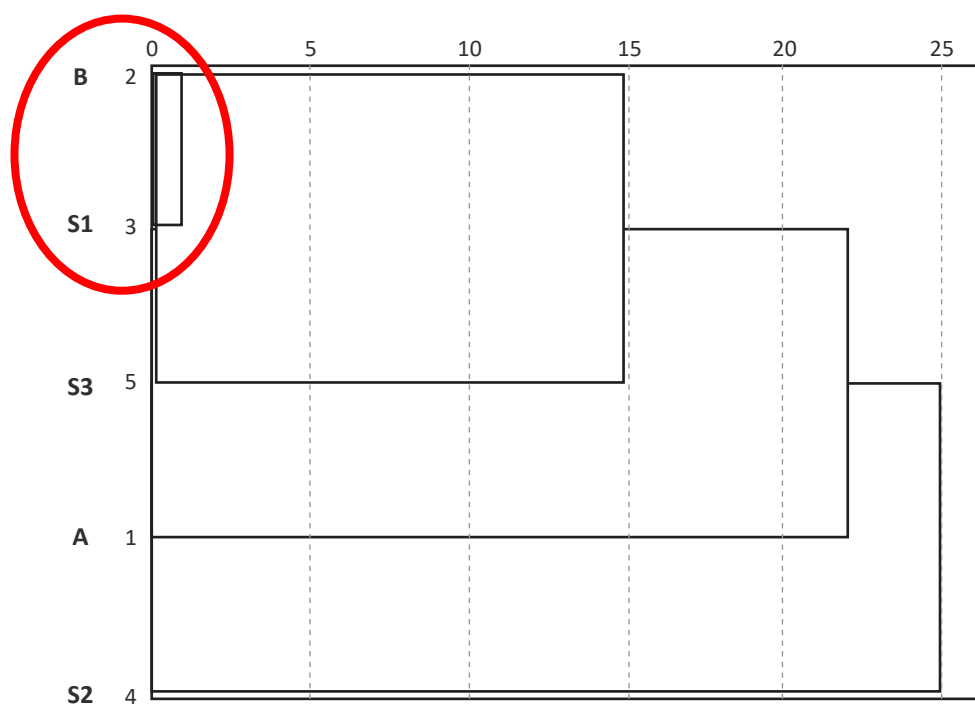


Figura 1. Análisis de grupo (SSPS). A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.

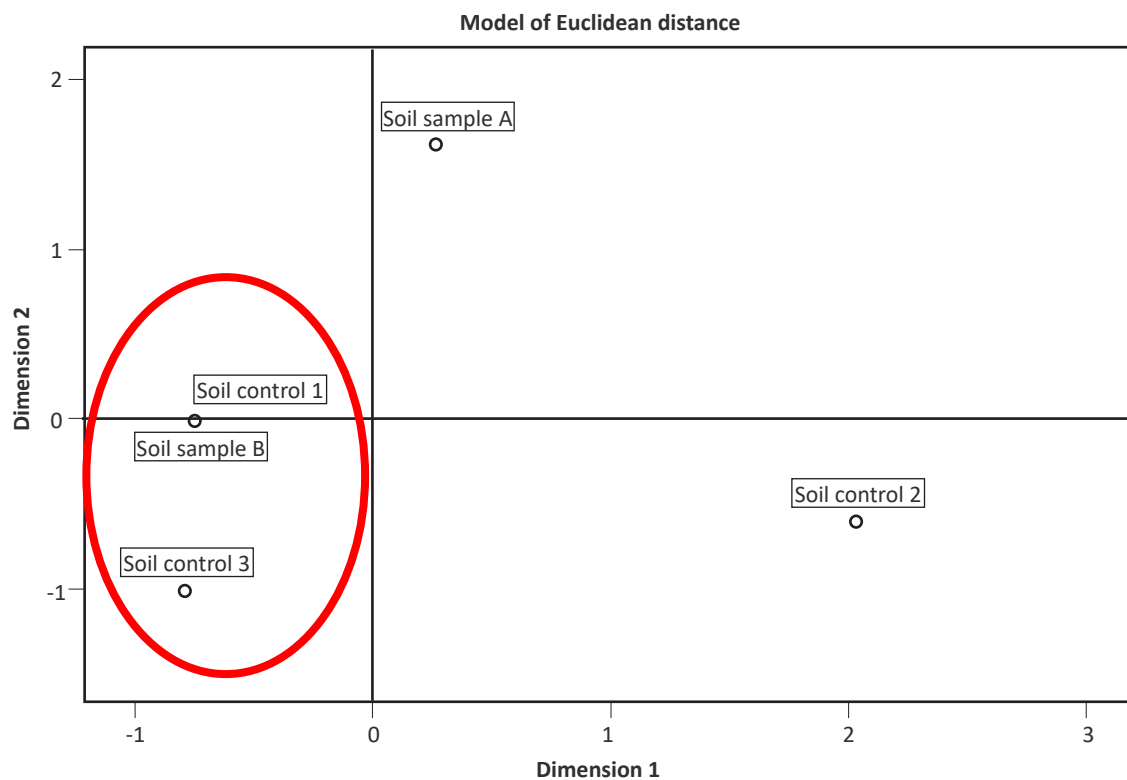


Figura 2. Multidimensional scaling (PROXCAL) usando distancias Euclideas. A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.

6.2.1.4. Discusión resultados morfotipos (IT-M-212)

Estos resultados están en consonancia con la información recibida del proveedor del test, ya que la muestra A procede de S1, la muestra B de una mezcla de la S1 y la S3, y la S2 resultó de un origen distinto. Sin embargo la interpretación, sin conocer los resultados a priori, es complicada y es de suponer **que el test hubiera sido resuelto parcialmente al no determinarse la mezcla o descartarse la procedencia de S1 a partir de A.**

6.2.1.5. Test intercomparativo: correlación entre T-RFLP de las muestras de tierra incluyendo los controles “Control samples S1, S2, S3, SA y SB”

Muestras de tierra a estudiar.

Tierras Control SA, SB, S1, S2, S3.

T-RFLP de los suelos control SA, SB, S1, S2 y S3.

Los T-RFLP de las muestras de tierra fueron realizados según el protocolo descrito en el ANEXO A. Los electroferogramas de las muestras en el ANEXO F.

6.2.1.6. Resultados del análisis estadístico de los T-RFLP obtenidos de los suelos del test intercomparativo

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de grupos SPSS (**Figura 3**), “suelo control A” se encuentra mucho más cercano a “suelo control 1” que a “suelo control 2” o “suelo control 3”, mientras que “suelo control B” está mucho más cercano a “suelo control 3” que a “suelo control 1” o “suelo control 2”. Estos resultados fueron confirmados por análisis PROXCAL con distancias euclídeas (**ver Figura 4**) mostrando una baja desviación estándar normalizada (0,00636) y coeficiente de Tucker (0,99682).

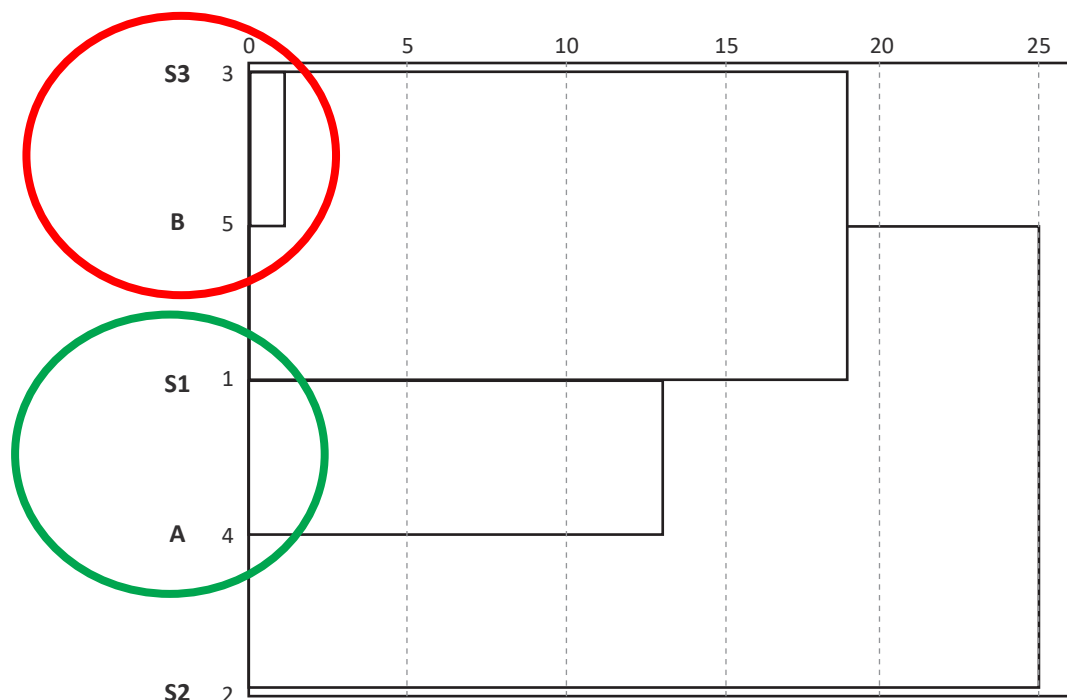


Figura 3. Análisis de grupo (SSPS). A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.

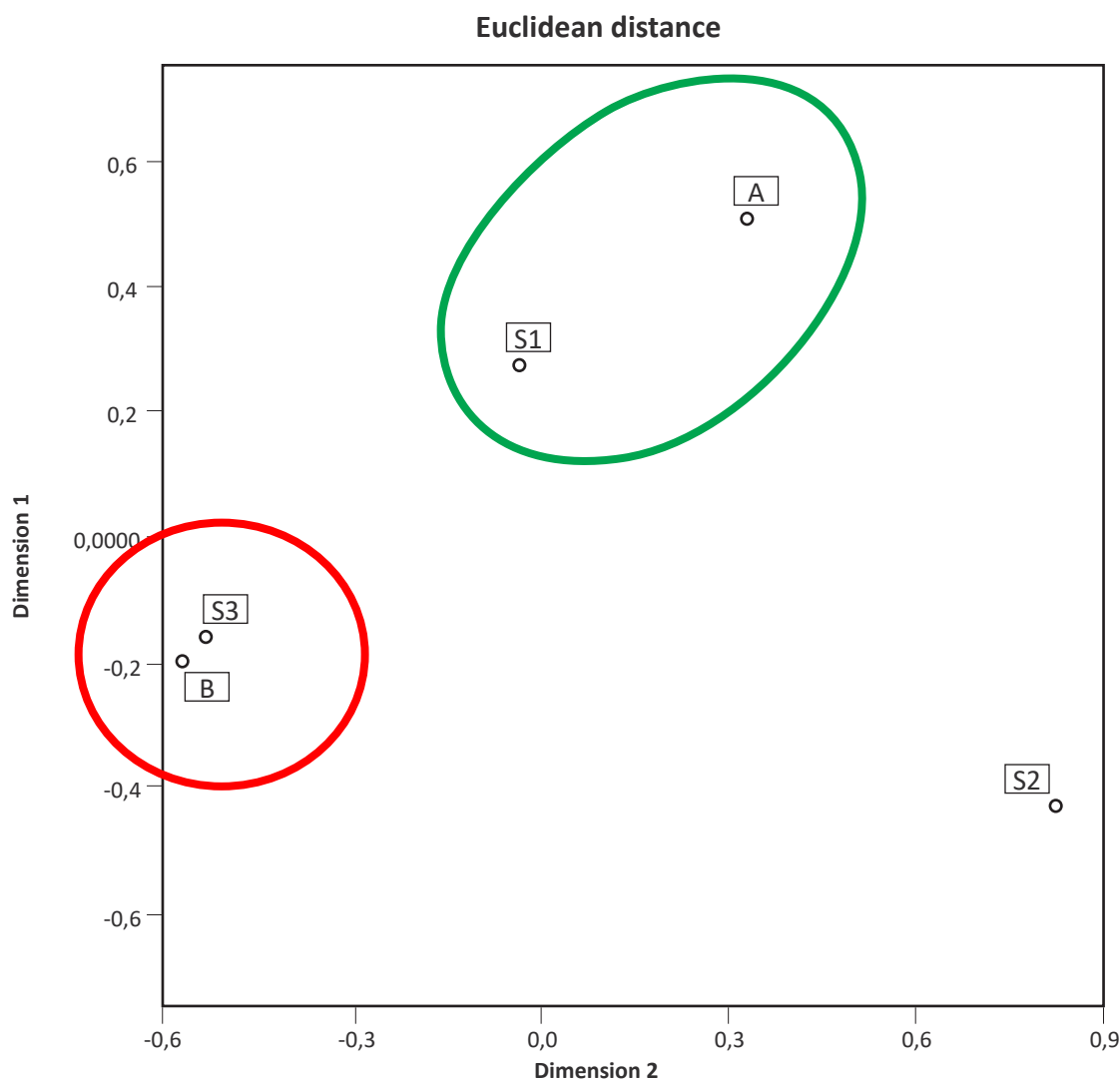


Figura 4 Multidimensional scaling (PROXCAL) usando distancias Euclideas. A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.

6.2.1.7. Discusión de los resultados obtenidos a partir T-RFLP de los suelos del test intercomparativo

Estos resultados están en concordancia con la información recibida del proveedor del test ya que la muestra A procede de la S1, la muestra B fue una mezcla de S1 y S3, y S2 tiene un origen diferente. Sin embargo determinar la mezcla en este caso, sin conocer los resultados a priori es complicado y muy probable que el test hubiera sido resuelto parcialmente al no determinarse la mezcla.

6.2.1.8. Discusión final comparativa

Se observó que mediante las técnicas de secuenciación genética del protocolo IT-M-212 y T-RFLP (MiS-AFE) se obtuvieron básicamente los mismos resultados y que fueron positivamente concluyentes cuando se evaluaron frente a los resultados facilitados por la organización del test intercomparativo⁶⁵.

⁶⁵ Diseñado por el ENFSI-APST-WG.

Esto es un avance significativo a la hora del estudio de muestras de suelo de interés criminalístico y forense ya que se pueden emplear ambas técnicas conjuntamente. La técnica de T-RFLP útil en ciencia forense, ya que permite descartar muestras no relacionadas de forma sencilla y rápida, aparte de comparar las relacionadas, mientras que la técnica de secuenciación de 500 pb del rDNA16S (IT-M-212) puede permitir en la comparativa una aproximación fina entre muestras de suelo objeto de cotejo.

En ambos casos el éxito del cotejo es directamente proporcional al empleo de herramientas estadísticas adecuadas y potentes.

6.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE ANÁLISIS T-RFLP GENÉTICO BACTERIANO EN MUESTRAS DE TIERRA PROPORCIONADAS POR DIFERENTES LABORATORIOS DEL CONSORCIO FP7-MISAFE

Se procedió a la validación del método utilizado en el proyecto (extracción de ADN, T-RFLP y análisis estadístico de los resultados). Para el estudio de los datos y la validación del cotejo estadístico se siguieron **dos estrategias diferentes**.

- **Estrategia 1:** Comparación de T-RFLPs de ADNs procedentes de suelos españoles frente a patrones consensuados de las distintas áreas españolas en estudio. Una de las 10 muestras analizadas se creó mediante la mezcla de diferentes T-RFLP procedentes de distintos suelos..
- **Estrategia 2:** Comparación de T-RFLPs procedentes de ADNs de suelos enviados por miembros del consorcio MiSAFE⁶⁶ frente a T-RFLP consenso de las diferentes áreas geográficas analizadas de España.

Para el procesamiento de los resultados se emplearon los programas GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, USA), T-Align (<http://inismor.ucd.ie/talign/index.html>), MS Excel y SPSS v22 (IBM). Los datos se importaron en GeneMapper y se analizaron con la opción AFLP. El tamaño de los máximos se seleccionó en el rango entre 100–500 bp y con intensidades de fluorescencia de 100 RFU, sin normalización.

Las tablas con los fragmentos se exportaron a MS Excel y se editaron en T-Align. T-align es un programa diseñado para obtener un único perfil consenso a partir de diferentes perfiles de una muestra y posteriormente alinear dichos perfiles consenso. Es un programa que para compensar las diferencias en las intensidades de los máximos obtenidos para cada banda en cada perfil, normaliza las áreas, para ello, divide cada área de la banda de un perfil por la suma total de las áreas obtenidas en dicho perfil.

Las siguientes figuras muestran gráficos elaborados según las distancias euclídeas entre muestras. Las tablas muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0).

Se consideró que un índice < de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente. En los dos tipos de representación, se indica el índice de eficiencia (SR).

Para determinar la similitud entre los perfiles consenso de cada grupo de suelos, se calcularon las distancias Euclídeas y de Bray-Curtis de una matriz de datos correspondiente a la presencia/ausencia de bandas (0/1) en dichos perfiles. Posteriormente se utilizó el paquete estadístico SPSS, usando el análisis multifactorial PROX-CAL, para las distancias euclídeas y el paquete de macros para el programa EXCEL (Microsoft) denominado Poptools (<http://www.cse.csiro.au/poptools>), para las distancias de Bray-Curtis.

6.3.1. Estrategia 1. Muestras de suelos españoles

Se han tomado un total de 81 muestras de suelo seco cribado que corresponden a 9 diferentes áreas geográficas. De cada área geográfica se tomaron tres muestras en una zona de 100 m de diámetro alrededor del punto a peritar. Cada una de las 27 muestras (9 áreas geográficas por 3 puntos de toma) se tomó por triplicado en tubos estériles.

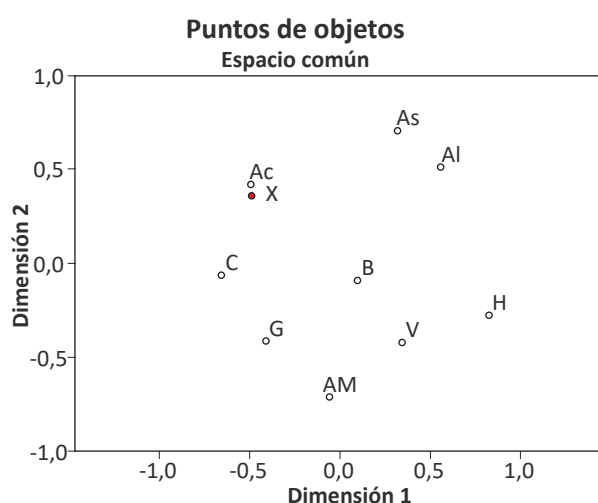
⁶⁶ España, Francia, Reino Unido, Israel.



Figura 5. Muestreo en España

Muestra 1

En este caso se coteja una muestra problema de A Coruña contra resto de muestras de suelos españoles. Para determinar la similitud entre los perfiles consenso de cada grupo de suelos, se calcularon las distancias Euclideas (análisis multifactorial PROXCAL) y de Bray-Curtis de una matriz de datos correspondiente a la presencia/ausencia de bandas (0/1) en dichos perfiles.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,04205
Estrés-I	,20506 ^a
Estrés-II	,57260 ^a
S-Estrés	,10841 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,95795
Coefficiente de congruencia de Tucker	,97875

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,044

b: Factor de escalamiento óptimo = ,933

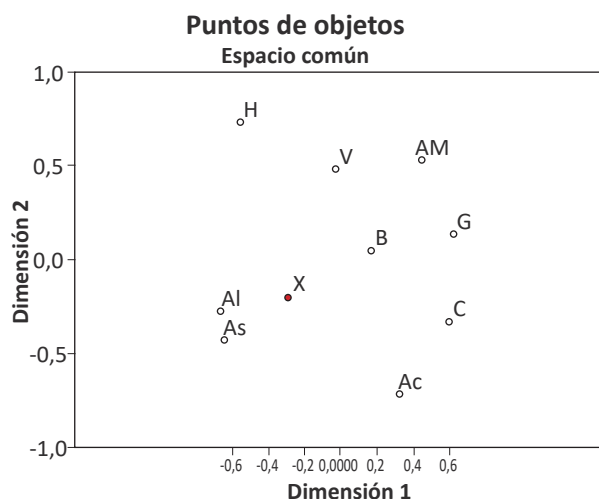
	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,45									
Am	0,51	0,46								
As	0,46	0,20	0,50							

B	0,51	0,40	0,45	0,46						
C	0,44	0,52	0,52	0,53	0,49					
G	0,54	0,58	0,50	0,62	0,44	0,52				
H	0,52	0,34	0,42	0,40	0,45	0,52	0,50			
V	0,48	0,39	0,39	0,44	0,33	0,49	0,42	0,31		
X	0,15	0,50	0,58	0,51	0,57	0,43	0,55	0,55	0,52	

Tabla 14: A Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema AC (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 2

En este caso se coteja una muestra problema de Alcalá de Henares contra resto de muestras de suelos españoles. Para determinar la similitud entre los perfiles consenso de cada grupo de suelos, se calcularon las distancias Euclideas (análisis multifactorial PROXSCAL) y de Bray-Curtis de una matriz de datos correspondiente a la presencia/ausencia de bandas (0/1) en dichos perfiles.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02987
Estrés-I	,17283 ^a
Estrés-II	,47626 ^a
S-Estrés	,06717 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97013
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98495

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,031

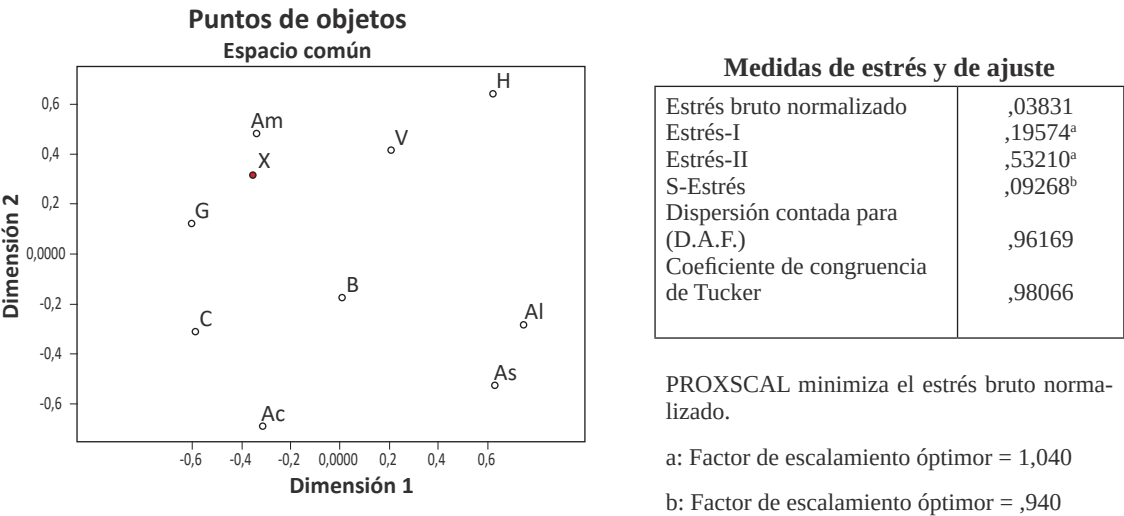
b: Factor de escalamiento óptimo = ,968

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,44	0,50				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,44	0,53	0,50			
V	0,47	0,39	0,39	0,45	0,34	0,47	0,41	0,31		
X	0,43	0,21	0,43	0,27	0,41	0,46	0,55	0,40	0,37	

Tabla 15: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema Al (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 3

Análogamente a las anteriores, en este caso la muestra problema que se coteja procede de Almería.

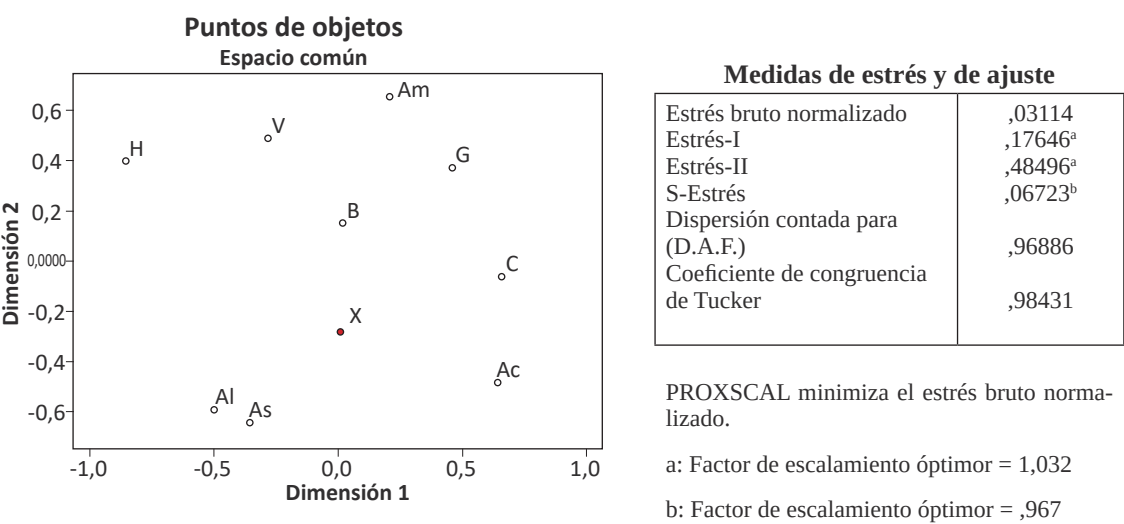


	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,48	0,40	0,46	0,46						
C	0,43	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,48				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,45	0,51	0,49			
V	0,47	0,38	0,39	0,43	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,53	0,52	0,22	0,55	0,48	0,52	0,49	0,49	0,48	

Tabla 16: Coruña (AC), Oviedo (As),Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema Am (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 4

La muestra problema que se coteja procede de Oviedo.

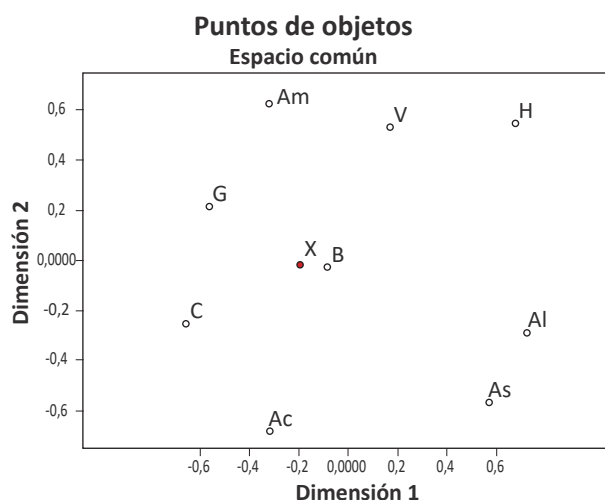


	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,46	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,53	0,50					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,44	0,52				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,44	0,53	0,50			
V	0,48	0,39	0,39	0,44	0,34	0,49	0,41	0,31		
X	0,48	0,33	0,45	0,27	0,43	0,44	0,54	0,47	0,45	

Tabla 17: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema As (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 5

La muestra problema que se coteja procede de Barcelona.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,04336
Estrés-I	,20823 ^a
Estrés-II	,56936 ^a
S-Estrés	,11995 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,95664
Coefficiente de congruencia de Tucker	,97808

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,045

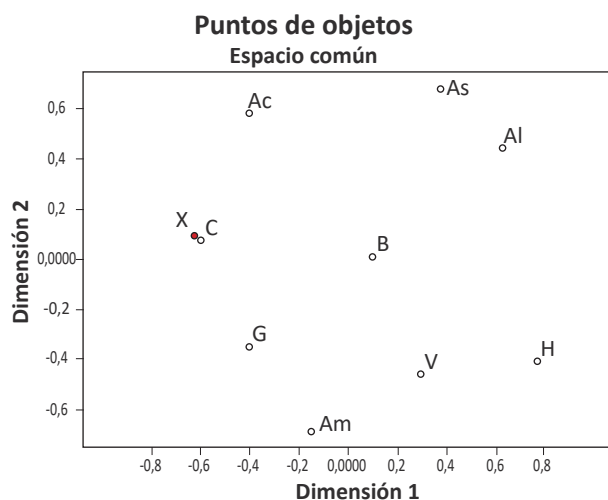
b: Factor de escalamiento óptimo = ,926

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,49	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,45	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,53	0,58	0,48	0,61	0,44	0,50				
H	0,51	0,34	0,42	0,40	0,45	0,51	0,50			
V	0,48	0,39	0,39	0,45	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,51	0,50	0,46	0,54	0,16	0,50	0,43	0,50	0,43	

Tabla 18: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema B (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 6

La muestra problema objeto de cotejo procede de Cáceres.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,04229
Estrés-I	,20565 ^a
Estrés-II	,56944 ^a
S-Estrés	,11050 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,95771
Coefficiente de congruencia de Tucker	,97863

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,044

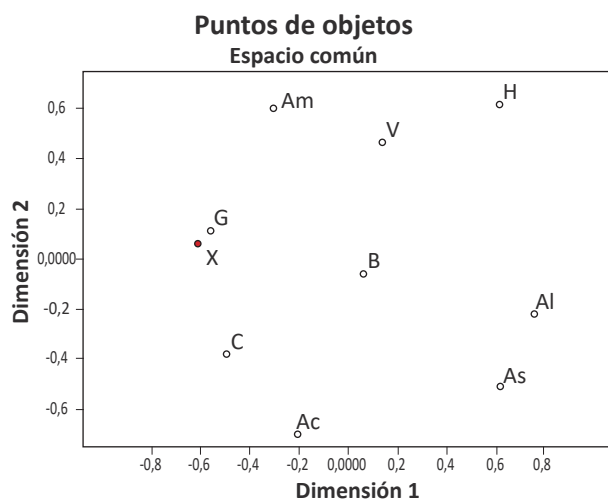
b: Factor de escalamiento óptimo = ,932

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,43	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,53	0,56	0,47	0,60	0,44	0,46				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,44	0,51	0,48			
V	0,47	0,39	0,39	0,45	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,45	0,56	0,56	0,55	0,55	0,16	0,52	0,59	0,56	

Tabla 19: Coruña (AC), Oviedo (AS), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (AL), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema C (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 7

En este caso la muestra problema que se coteja con las demás procede de Granada.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,04334
Estrés-I	,20818 ^a
Estrés-II	,57828 ^a
S-Estrés	,11085 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,95666
Coefficiente de congruencia de Tucker	,97809

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,045

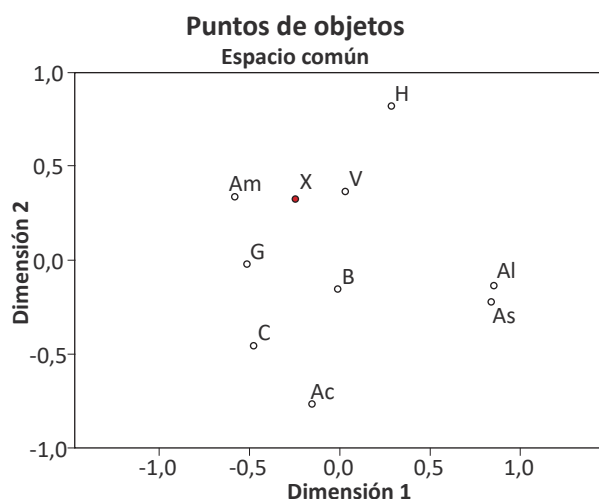
b: Factor de escalamiento óptimo = ,932

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,50	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,51	0,34	0,42	0,40	0,45	0,51	0,50			
V	0,48	0,39	0,39	0,45	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,60	0,66	0,60	0,70	0,57	0,57	0,23	0,65	0,54	

Tabla 20: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema G (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 8

La muestra problema objeto de cotejo procede de Huelva.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,03000
Estrés-I	,17320 ^a
Estrés-II	,44768 ^a
S-Estrés	,06669 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97000
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98489

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,031

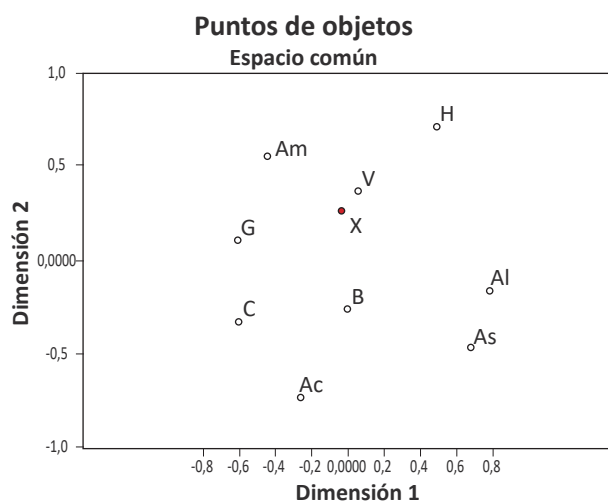
b: Factor de escalamiento óptimo = ,969

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,47								
As	0,45	0,20	0,48							
B	0,48	0,40	0,45	0,46						
C	0,43	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,59	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,45	0,51	0,50			
V	0,46	0,40	0,39	0,45	0,35	0,49	0,41	0,32		
X	0,55	0,48	0,41	0,52	0,45	0,50	0,42	0,29	0,39	

Tabla 21: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema H (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 9

Muestra problema que se coteja procede de Valencia.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,04228
Estrés-I	,20562 ^a
Estrés-II	,56606 ^a
S-Estrés	,11259 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,95772
Coefficiente de congruencia de Tucker	,97863

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,044

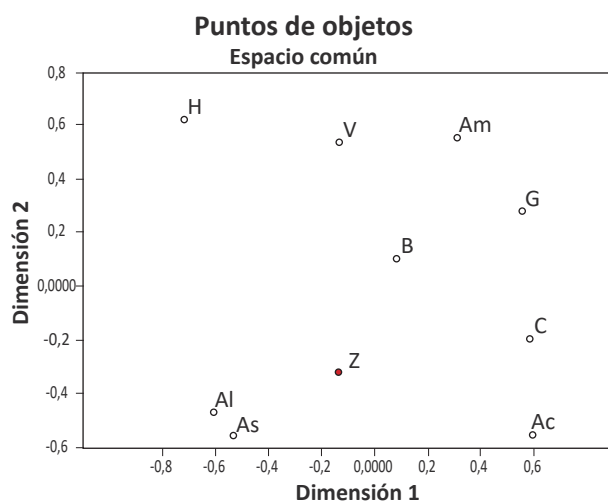
b: Factor de escalamiento óptimo = ,930

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,50	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,51	0,34	0,42	0,40	0,46	0,51	0,50			
V	0,46	0,38	0,39	0,43	0,36	0,47	0,41	0,31		
X	0,45	0,41	0,36	0,45	0,36	0,42	0,41	0,33	0,14	

Tabla 22: Coruña (Ac), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema V (X). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 10

Muestra problema que se coteja es una mezcla de suelos procedentes de Alcalá de Henares, Barcelona y Cáceres.



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02705
Estrés-I	,16447 ^a
Estrés-II	,44271 ^a
S-Estrés	,05924 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97295
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98638

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,028

b: Factor de escalamiento óptimo = ,972

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,48							
B	0,48	0,40	0,46	0,46						
C	0,43	0,51	0,51	0,52	0,50					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,44	0,53	0,50			
V	0,47	0,39	0,39	0,45	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,52	0,31	0,43	0,30	0,43	0,43	0,57	0,46	0,45	

Tabla 23: Coruña (Ac), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), Muestra problema, mezcla Al, B y C (Z). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

6.3.2. Resultados obtenidos mediante la estrategia 1

	Expected	Obtained	Correct data
X of Ac	<0,25	0,15	1
X of Al	<0,25	0,21	1
X of Am	<0,25	0,22	1
X of As	<0,25	0,27	0
X of B	<0,25	0,16	1
X of C	<0,25	0,16	1
X of G	<0,25	0,23	1
X of H	<0,25	0,29	0
X of V	<0,25	0,14	1
Mix Al, B and C	>0,25	0,31	1
Total correct data			8
SR		80%	

Tabla 24: Resumen de resultados correspondientes a las muestras analizadas estadísticamente según estrategia 1.

6.3.3. Discusión resultados estrategia 1

La tabla 24 muestra un resumen de los índices de Bray-Curtis obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas conforme a la estrategia 1. El índice de Bray Curtis esperado en cada uno de los análisis estadísticos efectuados era < 0.25 puesto que se esperaba que cada muestra problema presentara dicho índice respecto a su homóloga (si la muestra problema procede de Cáceres debe presentar <0.25 cuando se coteja con la muestra indubitada de Cáceres y > de 0,25 respecto al resto).

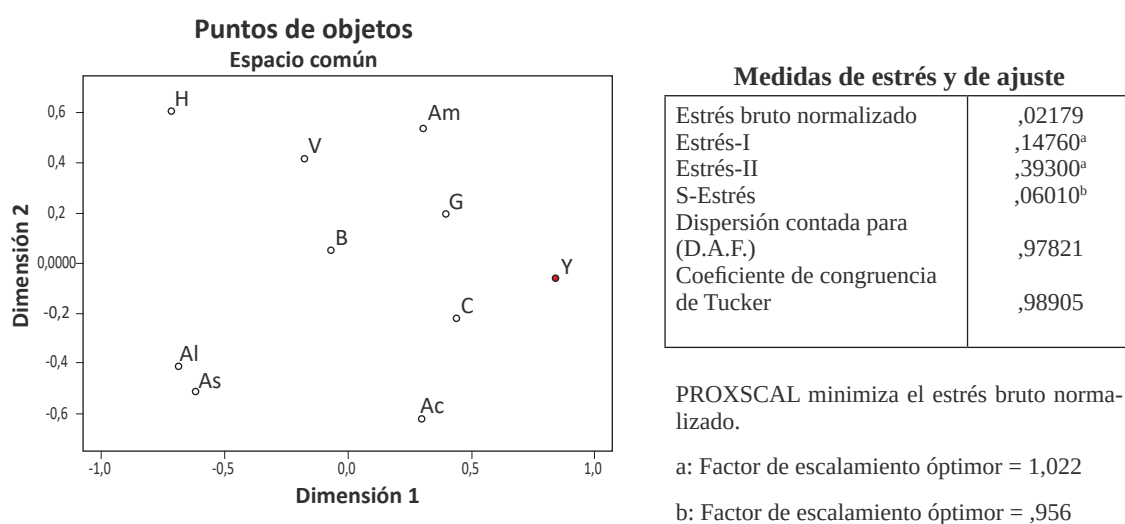
Análogamente, en el último caso, correspondiente a una mezcla de suelos, el índice Bray Curtis esperado es > 0.25, puesto que no debe presentar similaridad respecto a ninguna de las indubitadas de suelo con las que se coteja. Como se observa en la tabla 24 siguiente únicamente en dos de las 10 muestras analizadas (sombreadas), el índice observado es mayor de 0,25, pero los resultados son muy próximos a lo esperado. El índice de eficiencia (SR) constatado es del 80%.

6.3.4. Estrategia 2. Resultados de los análisis utilizando muestras suministradas por otros grupos de investigación del consorcio MiSAFE

Conviene recordar que la estrategia 2, que se citó anteriormente, consistió en la comparación de T-RFLPs procedentes de ADN de suelos **no españoles** enviados por miembros del consorcio MiSAFE⁶⁷ frente a T-RFLP consenso de las diferentes áreas geográficas analizadas de España.

Muestra 1

Muestra procedente de Escocia (Rathen)



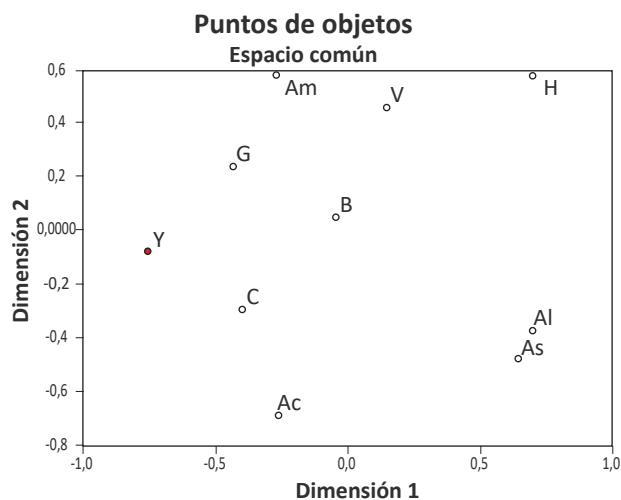
	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,49	0,40	0,47	0,47						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,48					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,52	0,35	0,43	0,40	0,44	0,52	0,51			
V	0,47	0,38	0,40	0,45	0,34	0,47	0,40	0,32		
X	0,64	0,63	0,59	0,64	0,68	0,60	0,67	0,68	0,63	

Tabla 25: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

⁶⁷ Francia, Reino Unido, Israel.

Muestra 2

Muestra procedente de Escocia (Rothansted)

**Medidas de estrés y de ajuste**

Estrés bruto normalizado	,03003
Estrés-I	,17330 ^a
Estrés-II	,46771 ^a
S-Estrés	,07763 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,96997
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98487

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,031

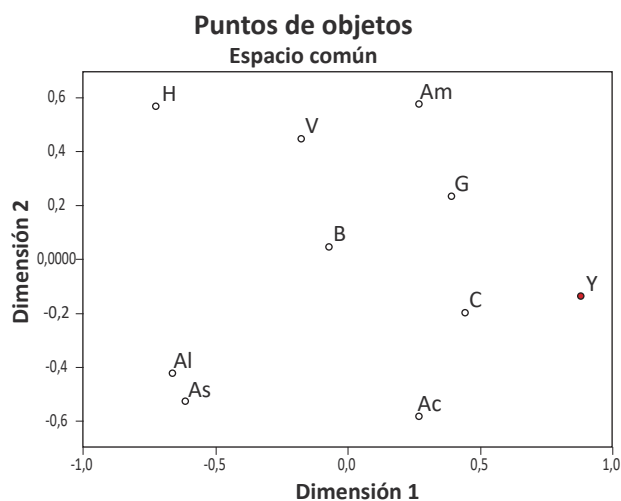
b: Factor de escalamiento óptimo = ,952

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,46								
As	0,45	0,20	0,49							
B	0,50	0,40	0,46	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,52	0,34	0,42	0,40	0,45	0,51	0,50			
V	0,48	0,39	0,39	0,45	0,35	0,47	0,41	0,31		
X	0,57	0,51	0,55	0,53	0,48	0,57	0,58	0,55	0,49	

Tabla 26: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 3

Muestra procedente de Escocia (Ardallie)

**Medidas de estrés y de ajuste**

Estrés bruto normalizado	,02242
Estrés-I	,14974 ^a
Estrés-II	,40139 ^a
S-Estrés	,05974 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97758
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98873

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,023

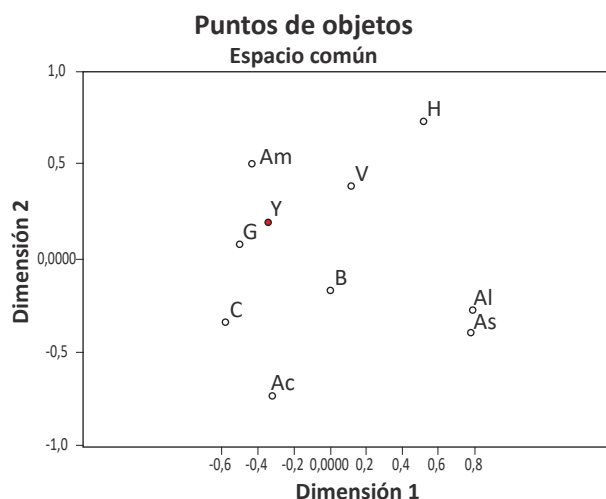
b: Factor de escalamiento óptimo = ,951

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,45									
Am	0,50	0,46								
As	0,44	0,20	0,49							
B	0,49	0,39	0,47	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,48					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,50				
H	0,50	0,35	0,43	0,40	0,43	0,52	0,51			
V	0,47	0,39	0,40	0,46	0,35	0,47	0,41	0,32		
X	0,59	0,59	0,63	0,62	0,61	0,57	0,66	0,62	0,57	

Tabla 27: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 4

Muestra procedente de Escocia (Hutton Institute)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02493
Estrés-I	,15790 ^a
Estrés-II	,40802 ^a
S-Estrés	,06568 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97507
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98746

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,026

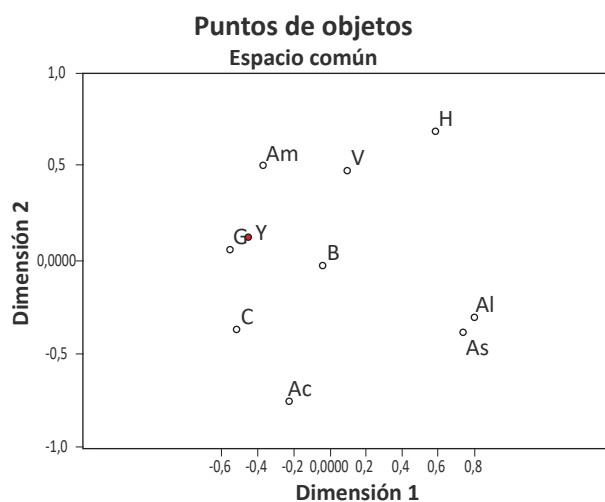
b: Factor de escalamiento óptimo = ,958

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,50	0,46								
As	0,45	0,19	0,49							
B	0,48	0,40	0,47	0,46						
C	0,43	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,56	0,48	0,61	0,46	0,46				
H	0,51	0,33	0,42	0,40	0,45	0,51	0,49			
V	0,47	0,37	0,39	0,44	0,35	0,47	0,40	0,32		
X	0,52	0,47	0,36	0,50	0,42	0,50	0,36	0,39	0,42	

Tabla 28: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 5

Muestra procedente de Escocia (Daumlichie).



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02221
Estrés-I	,14904 ^a
Estrés-II	,38418 ^a
S-Estrés	,05771 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97779
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98883

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,023

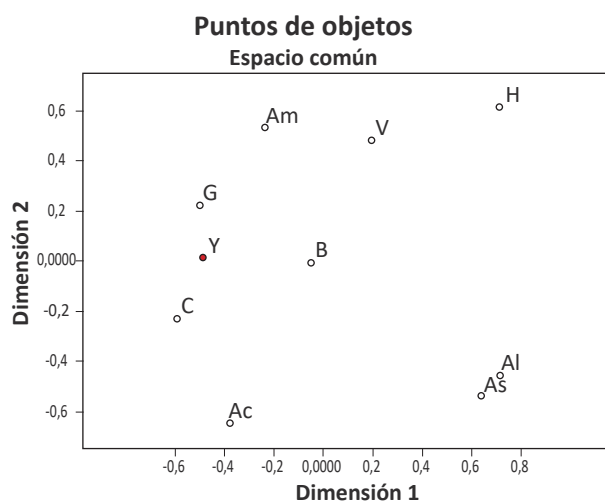
b: Factor de escalamiento óptimo = ,964

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,52	0,47								
As	0,45	0,20	0,48							
B	0,50	0,40	0,45	0,46						
C	0,44	0,51	0,51	0,52	0,49					
G	0,54	0,59	0,48	0,63	0,46	0,48				
H	0,52	0,34	0,43	0,40	0,45	0,52	0,49			
V	0,48	0,40	0,39	0,45	0,35	0,49	0,42	0,32		
X	0,58	0,53	0,46	0,52	0,44	0,49	0,43	0,45	0,46	

Tabla 29: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 6

Muestra procedente de Francia (Guyana)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,01948
Estrés-I	,13957 ^a
Estrés-II	,35741 ^a
S-Estrés	,05148 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,98052
Coefficiente de congruencia de Tucker	,99021

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,020

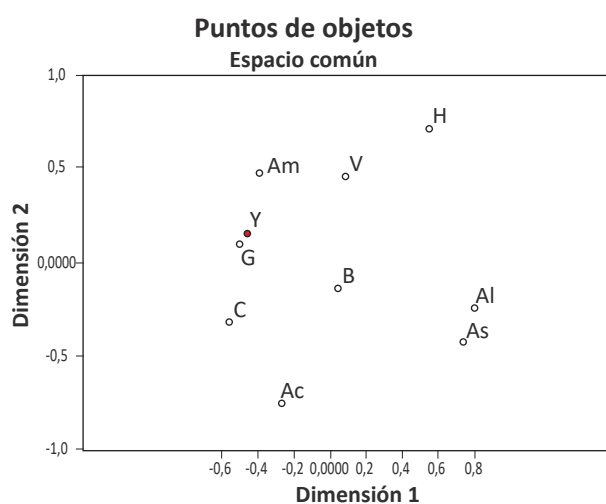
b: Factor de escalamiento óptimo = ,966

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,51	0,46								
As	0,45	0,20	0,48							
B	0,48	0,39	0,43	0,45						
C	0,43	0,51	0,50	0,52	0,49					
G	0,54	0,58	0,48	0,61	0,46	0,48				
H	0,51	0,35	0,41	0,41	0,45	0,49	0,49			
V	0,47	0,40	0,39	0,45	0,35	0,49	0,42	0,31		
X	0,50	0,52	0,47	0,51	0,38	0,44	0,43	0,52	0,47	

Tabla 30: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 7

Muestra procedente de Francia (Guyana 2)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02698
Estrés-I	,16425 ^a
Estrés-II	,42655 ^a
S-Estrés	,07010 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97302
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98642

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,028

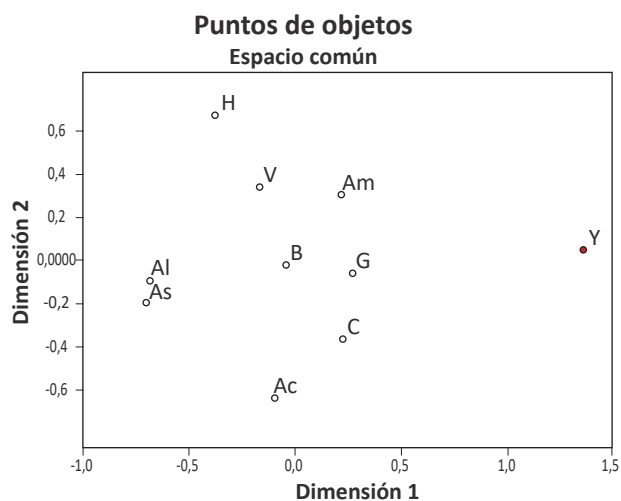
b: Factor de escalamiento óptimo = ,954

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,46									
Am	0,51	0,46								
As	0,45	0,19	0,49							
B	0,50	0,40	0,47	0,46						
C	0,44	0,51	0,50	0,52	0,49					
G	0,54	0,56	0,48	0,61	0,46	0,46				
H	0,52	0,33	0,41	0,40	0,45	0,51	0,49			
V	0,48	0,38	0,38	0,45	0,35	0,47	0,40	0,32		
X	0,58	0,57	0,36	0,54	0,49	0,50	0,35	0,47	0,46	

Tabla 31: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 8

Muestra procedente de Israel (Rendzina)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02124
Estrés-I	,14575 ^a
Estrés-II	,32327 ^a
S-Estrés	,07096 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97876
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98932

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,022

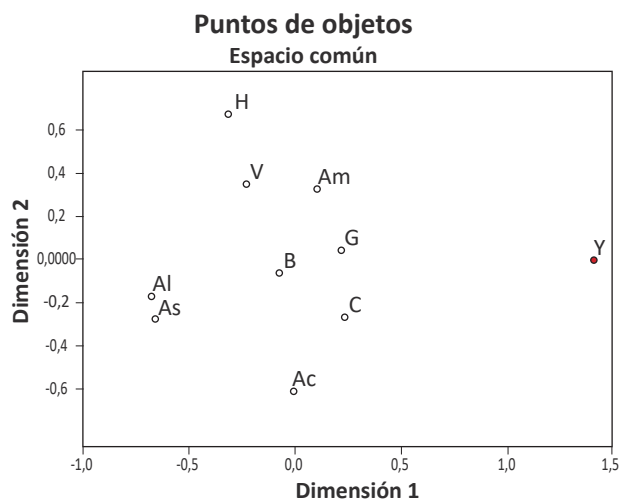
b: Factor de escalamiento óptimo = ,946

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,44									
Am	0,52	0,45								
As	0,43	0,20	0,49							
B	0,51	0,37	0,44	0,45						
C	0,43	0,51	0,49	0,53	0,47					
G	0,56	0,56	0,48	0,61	0,44	0,48				
H	0,51	0,34	0,42	0,40	0,43	0,49	0,50			
V	0,50	0,38	0,39	0,43	0,35	0,46	0,41	0,31		
X	0,70	0,61	0,64	0,65	0,61	0,63	0,69	0,61	0,67	

Tabla 32: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente.

Muestra 9

Muestra procedente de Israel (Terrarossa)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,03001
Estrés-I	,17325 ^a
Estrés-II	,36670 ^a
S-Estrés	,10124 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,96999
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98488

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,031

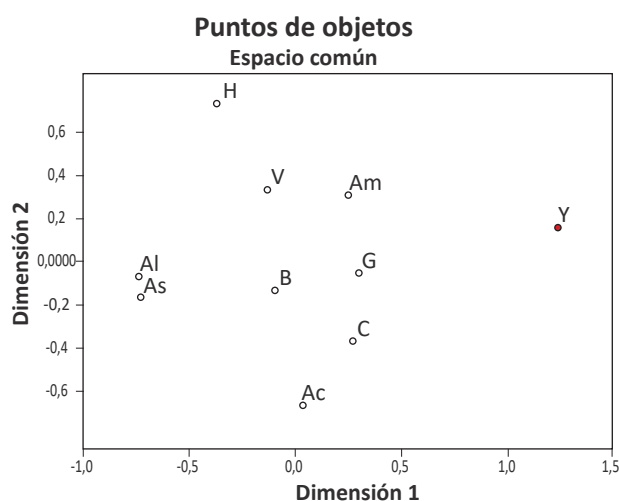
b: Factor de escalamiento óptimo = ,938

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,47									
Am	0,53	0,45								
As	0,45	0,20	0,48							
B	0,52	0,40	0,45	0,46						
C	0,44	0,49	0,49	0,52	0,47					
G	0,56	0,58	0,48	0,61	0,46	0,48				
H	0,54	0,35	0,41	0,42	0,45	0,50	0,49			
V	0,48	0,39	0,39	0,45	0,37	0,46	0,42	0,30		
X	0,63	0,55	0,61	0,57	0,58	0,55	0,69	0,52	0,58	

Tabla 33: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

Muestra 10

Muestra procedente de Israel (S)



Medidas de estrés y de ajuste

Estrés bruto normalizado	,02650
Estrés-I	,16278 ^a
Estrés-II	,38715 ^a
S-Estrés	,08475 ^b
Dispersión contada para (D.A.F.)	,97350
Coefficiente de congruencia de Tucker	,98666

PROXSCAL minimiza el estrés bruto normalizado.

a: Factor de escalamiento óptimo = 1,027

b: Factor de escalamiento óptimo = ,938

	Ac	Al	Am	As	B	C	G	H	V	X
Ac										
Al	0,45									
Am	0,52	0,45								
As	0,44	0,20	0,48							
B	0,50	0,39	0,46	0,46						
C	0,43	0,51	0,49	0,52	0,47					
G	0,56	0,56	0,48	0,61	0,48	0,48				
H	0,54	0,34	0,42	0,40	0,46	0,51	0,50			
V	0,48	0,38	0,39	0,43	0,35	0,46	0,41	0,31		
X	0,69	0,68	0,66	0,67	0,69	0,69	0,80	0,64	0,69	

Tabla 34: Coruña (AC), Oviedo (As), Barcelona (B), Cáceres (C), Alcalá Henares (Al), Valencia (V), Huelva (H), Granada (G), Almería (Am), muestra problema no española (Y). La tabla muestran los índices de Bray-Curtis, utilizando una matriz binomial de presencia/ausencia (binomial 1/0). Un índice <de 0,25 indica que es la misma muestra; entre 0,25 y 0,45 que la comparación es incierta, y que si es > 0,45 es diferente

6.3.5. Resultados obtenidos mediante la estrategia 2

	Expected	Obtained	Correct data
Y with spain soils	>0,42	0,59	1
Y with spain soils	>0,42	0,48	1
Y with spain soils	>0,42	0,57	1
Y with spain soils	>0,42	0,36	0
Y with spain soils	>0,42	0,43	1
Y with spain soils	>0,42	0,38	0
Y with spain soils	>0,42	0,36	0
Y with spain soils	>0,42	0,61	1
Y with spain soils	>0,42	0,52	1
Y with spain soils	>0,42	0,64	1
Total correct data			7
SR	70%		

Tabla 35: Resumen de resultados correspondientes a las muestras analizadas estadísticamente según estrategia 2.

6.3.6. Discusión de resultados obtenidos con la estrategia 2

La tabla 35 muestra un resumen de los índices de Bray-Curtis obtenidos a partir de las diferentes muestras analizadas conforme a la estrategia 2. El índice de Bray Curtis esperado en cada uno de los análisis estadísticos efectuados era >0.42 puesto que se esperaba que ninguna muestra problema presentara similitud respecto a las muestras indubitadas procedentes de suelos españoles. Únicamente en tres de las 10 muestras analizadas (sombreadas), el índice observado es menor de 0.42, pero los resultados son muy próximos a lo esperado. En todos los casos el índice de Bray-Curtis fue mayor de 0.25. Los resultados indican, de acuerdo con Quaak y Kuiper⁶⁸, que todas las muestras tienen un diferente origen, con un índice de Bray-Curtis mayor de 0.42 en la mayoría de los casos y, en el resto, significativamente mayor de 0.25. El índice de eficiencia (SR) constatado es del 70%.

6.3.7. Discusión final de resultados obtenidos con estrategias 1 y 2

Una vez analizados los resultados que figuran en las tablas 24 y 35, que corresponden, respectivamente, a los resúmenes de resultados obtenidos conforme a las estrategias 1 y 2, se concluye que la **media** de los índices de eficiencia (**SR**) correspondientes a las mencionadas estrategias de análisis, fue de un **75%**. Dicho SR es el resultado de una interpretación muy restrictiva, tal y como se ha mencionado, considerando 2 falsos negativos y 3 falsos positivos en los 20 análisis realizados, con los matices ya descritos.

En el caso de los resultados obtenidos conforme a la estrategia 2 estamos hablando de tres resultados con índice Bray Curtis muy próximos a 0,42 y en todos los casos mayores de 0,25. Por lo tanto, realmente se podría contemplar un índice SR global del método que oscilara entre el **80-85%**. Además debe tenerse en cuenta que estamos hablando de COTEJO y no de fiabilidad de técnica analítica.

La correlación depende de las características de los datos y las herramientas de procesamiento elegidas. El paquete estadístico SPSS, usando el análisis multifactorial PROXCAL, para las distancias euclídeas y el paquete de macros para el programa EXCEL (Microsoft) denominado Poptools (<http://www.cse.csiro.au/poptools>), para las distancias de Bray-Curtis fue decisivo para la obtención de los resultados reflejados en esta Tesis. Todo estudio de este tipo debería acompañarse con un modelo de decisión para definir qué similitudes deben ser tenidas en cuenta para que las muestras sean consideradas coincidentes o no coincidentes, cuando los datos no son concluyentes.

⁶⁸ QUAACK, F.C.A., KUIPER, I. "Statistical data analysis of bacterial T-RFLP profiles in forensic soil comparisons." Forensic Science International nº 210, 2011, págs. 96 y ss.

Si tenemos en cuenta, como se ha explicado a lo largo de este capítulo I , que se obtienen resultados de cotejo comparables mediante las dos técnicas analíticas descritas (IT-M-212 y T-RFLP,s) y se asumen las consideraciones descritas en este apartado, podemos concluir que el cotejo genético-microbiológico en suelos mediante técnica de fragmentos T-RFLP es una herramienta más que fiable en el ámbito criminalístico, conclusión que , por analogía, se puede asumir en el caso del cotejo de secuencias genéticas procedentes de morfotipos bacterianos.

CAPÍTULO II

La prueba pericial microbiológica en suelos

1. ASPECTOS ESENCIALES DE LA PRUEBA EN EL SISTEMA PROCESAL ESPAÑOL

Según GIMENO SENDRA⁶⁹ las fuentes del Derecho procesal penal vienen integradas por la Constitución, los Pactos Internacionales de Derechos Humanos, la Ley de Enjuiciamiento Criminal y las Leyes Especiales, siendo nuestra Ley de Enjuiciamiento Criminal (LECrim) de 14 de Septiembre de 1882, la que constituye nuestro Código Procesal Penal a cuyos preceptos han de someterse todos los tribunales conforme a lo dispuesto en el **principio de legalidad procesal**, consagrado en su artículo 1: “*No se impondrá pena alguna por consecuencia de actos punibles cuya represión incumba a la jurisdicción ordinaria, sino de conformidad con las disposiciones del presente Código o de Leyes especiales y en virtud de sentencia dictada por Juez competente*”. Dada su antigüedad ha sufrido multitud de reformas, siendo la última la correspondiente a la obra por la **Ley 41/2015, de 5 de octubre, de modificación de la Ley de Enjuiciamiento Criminal** para la agilización de la justicia penal y el fortalecimiento de las garantías procesales.

Complejas son las extensas teorías que pretenden definir el concepto de prueba, pero aplicando el principio de parsimonia de OCCAM⁷⁰, se puede aplicar el concepto de prueba a una actividad que se desarrolla en el interior de un procedimiento, en este caso, penal, que va dirigida a la averiguación de los hechos y sobre la que el Tribunal sentenciador basará su Sentencia, bien absolutoria, bien condenatoria. En cuanto a los tipos de pruebas que existen, las más comunes en derecho penal son la declaración del acusado, testifical, documental y pericial.

El sistema procesal español no exige que Jueces y Magistrados expresen las razones por las que deciden otorgar o no eficacia a una prueba determinada. Como indica DOLZ⁷¹, se consideran prueba directa las llamadas primarias, entre las que se encuentran la confesión, la testifical, la documental y la inspección ocular. Se denomina prueba indiciaria la que se obtiene por presunciones o indicios, según la cual se induce un hecho a partir de otro hecho básico, en virtud de una relación de inferencia apoyada en criterios de racionalidad.

Según GIMENO SENDRA⁷² corresponde, en primer lugar exclusivamente a las partes acusadoras y no a la defensa, proponer y ejecutar una prueba válida y suficiente para demostrar la participación del encausado en el hecho punible. A la acusación corresponde y no a la defensa (la que se vería sometida a una “*probatio diabólica*” de los hechos negativos) la realización de esa “actividad probatoria de cargo” necesaria para desvirtuar el principio de presunción de inocencia.

Como ciertos autores⁷³ han indicado, no suelen establecerse diferencias entre prueba anticipada y prueba preconstituida, aunque estemos ante dos supuestos distintos. Así pues, y en primer lugar, la prueba anticipada será aquella practicada en la fase de instrucción ante el/la Juez instructor/a con la participación del acusado, cuando razonablemente se estime que no podrá ser practicada en el juicio oral. Tal y como apunta el artículo 657 de la LECrim las partes, en el escrito de calificación, podrán solicitar la práctica de aquellas diligencias de prueba que por cualquier causa no pudieran ejecutarse en el juicio oral.

La prueba preconstituida comprenderá tanto aquellos supuestos que tienen en común la imposibilidad o dificultad de reproducir en el juicio oral cierta clase de diligencias (análisis químicos, genéticos, informes dactiloscópicos, partes médicos, inspecciones oculares, reconstrucciones de hechos, etc.) como aquellas diligencias que aun siendo reproducibles no lo serían en idénticas circunstancias.

También hay que decir que aunque no sean prueba preconstituida porque no se han practicado ante el Juez de Instrucción, el art.730 de la LECrim permite reproducir en el juicio mediante su lectura los actos de investigación practicados en el sumario que, por causas independientes a la voluntad de las partes, no puedan ser reproducidas en el juicio oral. En estos casos, se considera prueba documental⁷⁴.

⁶⁹ GIMENO SENDRA, Vicente. *Manual Derecho procesal penal*. Ediciones Jurídicas Castillo de Luna, D.L. Madrid, 2015, pág.45.

⁷⁰ La navaja de Occam, principio de economía o principio de parsimonia (*lex parsimoniae*), es un principio metodológico y filosófico atribuido al fraile franciscano, filósofo y lógico escolástico Guillermo de Occam (1280-1349), según el cual: *En igualdad de condiciones, la explicación más sencilla suele ser la más probable*. Esto implica que, cuando dos teorías en igualdad de condiciones tienen las mismas consecuencias, la teoría más simple tiene más probabilidades de ser correcta que la compleja.

⁷¹ DOLZ LAGO, M. J. *La prueba...* Op. cit, pág.94

⁷² GIMENO SENDRA, V. *Manual Derecho procesal penal*. Op. cit, pág.92.

⁷³ SIBONY, R., SERRANO OCHOA, M^a. A., REINA, O. *La prueba y el derecho a la dispensa del deber de declarar por la testigo-víctima en los procedimientos de violencia de género*. http://noticias.juridicas.com/conocimiento/articulos-doctrinales/4652_01/04/2011

⁷⁴ DOLZ LAGO, M. J. *La prueba...* Op. cit, pág.93.

Según ÁLVAREZ⁷⁵ el proceso penal “se divide en dos fases bien distinguidas: por un lado la fase de instrucción, donde rige el principio de investigación de oficio y se practican las diligencias de investigación y por otro lado la fase de juicio oral, en el marco de la cual se desarrollan los actos probatorios que se encuentran revestidos por el principio de aportación de parte”. Además, continúa la autora, existe una fase intermedia que es aquella que va desde que se cierra o concluye la fase de instrucción hasta el momento que el órgano judicial dicta, bien el auto de sobreseimiento provisional o libre, bien el auto de apertura del juicio oral. El Juez o Tribunal sólo puede formar su convicción sobre la base de la prueba producida oralmente en su presencia y directamente percibida (art. 741 LECrim.).

Como indica GÓMEZ DE LIAÑO⁷⁶, “junto a las pruebas plenas o directas, son admisibles las denominadas indirectas, indiciarias o coyunturales en aquellos casos en los que la convicción judicial se forma sobre la base de varios indicios plenamente probados para llegar a unas conclusiones con las que tienen un enlace directo y con la debida motivación.”

Al abordar el estudio de la prueba penal es importante no perder de vista qué principios del proceso penal están relacionados con la prueba. De entre todos ellos (principio de la verdad material, dispositivo, defensa, presunción de inocencia, igualdad de armas, contradicción, oralidad, inmediación, “*in dubio pro reo*”, etc.) el principio de **libre valoración de la prueba** será comentado a continuación por considerarse fundamental en el ámbito de la prueba pericial.

En virtud de este principio, el Juez o Tribunal no tiene otro límite que los hechos probados en el juicio oral, los cuales ha de apreciar basándose en las normas de la experiencia o de la lógica (art. 741 LECrim). El derecho constitucional a la presunción de inocencia es un derecho del encausado que fundamentalmente se quebranta cuando no se haya practicado una actividad probatoria de cargo suficiente para deducir razonablemente la participación del acusado en el hecho punible. La STC 55/2015⁷⁷ de 16 de marzo considera de interés, respecto a la libre valoración de la prueba, que dicha valoración debe ponderar los distintos elementos que constituyen la actividad probatoria, tanto los que resulten a favor como los que resulten contrarios a los intereses del inculcado.

Antes de introducir los aspectos particulares referentes a la prueba pericial, es interesante hacer referencia a qué se entiende por prueba en el ámbito penal. Así, en la revisión que efectúa ÁLVAREZ⁷⁸, la autora aporta diversas definiciones enunciadas por diversos autores que ayudan a contextualizar y fijar el concepto de prueba en el ámbito penal español. Así, citando textualmente a la autora: “...siguiendo a HUERTAS MARTIN, podemos concebir la prueba como todo motivo o razón aportado al proceso por los medios y procedimientos aceptados en la ley para llevar al juez el convencimiento o la certeza sobre los hechos que son objeto del proceso... De modo más sintético GUZMÁN FLUJA considera que la prueba es todo medio o instrumento que permite introducir en el proceso y hacer llegar al juez los elementos necesarios para poder decidir sobre el juicio de hecho... En conclusión podemos sostener que la prueba es la actividad esencial en el proceso, pues justifica y fundamenta la resolución judicial que decide el litigio”.

1.1. LA PRUEBA PERICIAL

Indica DE LUCA⁷⁹ que “hoy en día, la gran atención al problema de las relaciones entre Ciencia y Derecho se ha convertido en preocupación por el uso que de la Ciencia se puede hacer en un proceso. Desde siempre los jueces han utilizado nociones científicas para interpretar y reconstruir los acontecimientos. Sin embargo, el

⁷⁵ ÁLVAREZ BUJÁN, M.V. *Reflexiones críticas en torno a la prueba en el proceso penal español: especial referencia a la prueba preconstituida y a la prueba anticipada*. Boletín Ministerio Justicia nº 2180, 2015, págs. 6 y 7.

⁷⁶ GÓMEZ DE LIAÑO GONZÁLEZ, F. *El proceso penal tratamiento jurisprudencial*. 7ª Edición. Ed. Forum, Oviedo, 2004, págs.323-326.

⁷⁷ “... «el principio de libre valoración de la prueba, reconocido en el art. 741 de la L.E.Cr., exige para que pueda considerársele ajustado a la Constitución, que se ponderen los distintos elementos que constituyen la actividad probatoria, sin que de esa ponderación pueda excluirse, como ocurre en el caso que nos ocupa, la prueba de descargo realizada en el juicio oral, ya que ello supone desconocer los derechos del inculcado consagrados en el art. 24.2 de la Norma fundamental» (STC 145/1985, de 28 de octubre, FJ 6; en el mismo sentido, entre otras, SSTC 180/2002, de 14 de octubre, FJ 3; 148/2009, de 15 de junio, FJ 4; 104/2011, de 20 de junio, FJ 2; 88/2013, de 11 de abril, FJ 12, y 133/2014, de 22 de julio, FJ 8).”

⁷⁸ ÁLVAREZ BUJÁN, M.V. *Reflexiones críticas en torno a la prueba en el proceso penal español: especial referencia a la prueba preconstituida y a la prueba anticipada*... Op. cit., págs. 9 y 10.

⁷⁹ DE LUCA, S., NAVARRO, F. y CAMERIERE, R. La prueba pericial y su valoración en el ámbito judicial español. *Revista Electrónica de Ciencia Penal y Criminología* (en línea). 2013, núm. 15-19, págs. 19:1-19:14. Disponible en internet: <http://criminnet.ugr.es/recpc/15/recpc15-19.pdf> [RECPC 15-19 (2013), 26 dic.]

progreso científico-tecnológico de las últimas décadas ha hecho que los tribunales intervengan más a menudo en disputas relacionadas con la aplicación de procedimientos científicos en el ámbito legal”.

A la hora de someter la prueba pericial a su libre valoración que no arbitrariedad, cita LEAL MEDINA⁸⁰, que “no puede pretenderse que un Juez sepa de biología, ingeniería, medicina o química, como un graduado en esas materias. Por lo tanto, es necesario que un experto en las mismas, el perito, acuda al proceso para dictaminar sobre aquellos puntos en los que es preciso el conocimiento en profundidad de una ciencia no jurídica, como indica el artículo 456 de la LECrim.”

VEGAS TORRES⁸¹ define la prueba pericial como “la actividad procesal en cuya virtud una o varias personas expertas en materias no jurídicas, elaboran y transmiten al tribunal información especializada dirigida a permitir a éste el conocimiento y apreciación de hechos y circunstancias fácticas relevantes en el proceso.”

Como expone GARCÍA RUIZ⁸² la prueba pericial, por lo tanto, es “aquella que surge del dictamen de los peritos, siendo éstos los expertos o especialistas llamados a informar al Juzgador.” Ahondando en la definición, consiste en la explicación al Juez o Tribunal de la solución a un problema sobre el que se ha realizado un previo análisis en base a una metodología técnico-científica. Los peritos que informan en la instrucción penal han de ser imparciales. La Ley exige que todos ellos, tanto los nombrados por el juez como los designados por las partes, presten juramento “*de proceder bien y fielmente en sus operaciones y de no proponerse otro fin más que el de descubrir y declarar la verdad*” (art. 474 LECrim).

Como indica VEGAS TORRES⁸³ “si la pericia de que se trate puede volver a realizarse, llegado el caso, en la fase de juicio oral, la Ley no permite que los peritos nombrados por el juez de instrucción sean recusados. La recusación queda limitada, pues, sólo a las pericias que no puedan repetirse en la fase de juicio oral (art. 467 LECrim).”

1.1.1. Propuesta de la prueba pericial

La prueba, conforme al artículo 728 de la LECrim, será propuesta por aquella parte a la que interese a su derecho, indicando el objeto sobre el que debe recaer el reconocimiento pericial.

1.1.2. Pertinencia

Como indica GARCÍA RUIZ⁸⁴ “el juez declarará procedente la prueba propuesta cuando estime que para conocer algún hecho sustancial litigioso sean necesarios conocimientos científicos o artísticos, según establece el artículo 456 de la LECrim. Es lógico que corresponda la declaración de procedencia al Juez, dado que en última instancia, la prueba está dirigida a su asesoramiento, con el fin último de contribuir a la formación de la convicción judicial”.

1.1.3. Peritos, nombramiento y obligación de comparecer

CARRASCO ANDRINO⁸⁵ explica que la adquisición de la condición de perito se produce con el nombramiento por la autoridad judicial, tras la aceptación del cargo en el proceso civil o la prestación de juramento o promesa en el proceso penal y se fundamenta en el deber de colaboración con la Administración de Justicia que marca el art. 118 CE.

⁸⁰ LEAL MEDINA, J.: “El tratamiento procesal y penal del ADN. Aspectos biológicos y jurídicos que definen su aplicación y las consecuencias que produce en el campo de la prueba”, en Diario la Ley, nº 8190. Noviembre 2013. Tal y como señala Leal Medina, la actividad probatoria y su valoración judicial están atribuidas por entero al Tribunal sentenciador, al albur de su libre apreciación, por lo que su conocimiento exige de unos parámetros serios y fiables para su eficacia jurídica.

⁸¹ VEGAS TORRES, J. *Análisis sobre la prueba pericial en la Ley de Enjuiciamiento Civil y en el proceso penal español*. Disponible en www.iapsif.es/app/download/5966867/La+prueba+pericial.pdf Pág.1

⁸² GARCÍA RUIZ, F. Capítulo “La prueba pericial” en *Técnicas de Investigación Criminal (Ibáñez Peinado, J.)* 2ª edición, Ed. Dykinson, Madrid., 2012, pág. 708.

⁸³ VEGAS TORRES, J. *Análisis sobre la prueba pericial...Op.cit*, pág. 18.

⁸⁴ GARCÍA RUIZ, F. En “La prueba pericial” en *Técnicas de Investigación...Op. cit*, pág. 709.

⁸⁵ CARRASCO ANDRINO, Mª del Mar *La falsedad en el dictamen pericial o en la traducción del intérprete en causa judicial*. Cuadernos de política criminal. Número 110, II, Época II, septiembre 2013, pág.13

Con carácter general, la ley dispone que *“todo reconocimiento pericial se hará por dos peritos”* (art. 459 LECrim). Conforme al art.484 LECrim, en caso de ser dos peritos y no concordar en el dictamen deberá nombrarse un tercero para dirimir las diferencias. Para el procedimiento abreviado, que es el más frecuente en la práctica, se establece, sin embargo, que *“el informe pericial podrá ser prestado sólo por un perito cuando el juez lo considere suficiente”* (art 778.1 LECrim).

En este sentido la STS 240/2013, de 30 de enero, indica la plena validez del informe evacuado por un solo perito, dentro del procedimiento ordinario⁸⁶. La designación debe recaer, en principio, en el personal técnico adscrito a los órganos jurisdiccionales. En el caso en que se encuentra el Servicio de Criminalística de la Guardia Civil, la L.O. 2/1986 de Fuerzas y Cuerpos de Seguridad, en su artículo 11.1, atribuye a la policía, junto a la función de investigar delitos y asegurar los instrumentos, efectos y pruebas del delito, la de *“(…) elaborar los informes técnicos y periciales pertinentes.”* Por otro lado, establece el art. 462 de la LECrim que *“nadie podrá negarse a acudir al llamamiento del Juez para desempeñar un servicio pericial, si no estuviese legítimamente impedido. En este caso deberá ponerlo en conocimiento del Juez en el acto de recibir el nombramiento, para que se provea a lo que haya lugar.”*

1.1.4. Participación de las partes

El art. 476 LECrim establece que *“al acto pericial podrán concurrir, en el caso de que no pudiesen reproducirse en juicio oral, el querellante, si lo hubiere, con su representación, y el procesado con la suya aun cuando estuviere preso, en cuyo caso adoptará el Juez las precauciones oportunas”*.

1.1.5. Ejecución de la pericia y el informe pericial

El derecho a la presunción de inocencia puede verse vulnerado si se dicta una condena basada en informes periciales sin que los peritos hayan comparecido en el acto del juicio oral. No obstante, cierta tipología de informes excepcionalmente pueden aportarse al juicio como prueba documental, sin necesidad de que los peritos comparezcan para ratificarse en el juicio oral. Se trata de los *“informes emitidos por laboratorios oficiales”⁸⁷ sobre la naturaleza, cantidad*

⁸⁶ La STS 350/2010, de 23 de abril, cita: *“Hemos declarado (Sentencia 1076/2006, de 27 de octubre y Sentencia 1076/2002, de 6 de junio), que el art. 459 de la Ley de Enjuiciamiento Criminal dispone que en el procedimiento ordinario el dictamen pericial se hará por dos peritos, si bien, en el párrafo segundo, exceptúa el caso de que no hubiese en el lugar más de uno y no fuera posible esperar a la llegada de otro sin graves inconvenientes para el curso del sumario. Las previsiones de este precepto, que se entienden mejor si se tiene en cuenta la fecha en que fue redactado, demuestran que la dualidad de peritos se justifica en la búsqueda de una mayor certeza y rigor técnico, pero no es condición inexcusable del informe pericial que puede ser válido, en algunos casos, aún prestado por un solo perito”*.

⁸⁷ El Tribunal Supremo, en su Sentencia 53/2011 de 10 de febrero, efectúa la siguiente clasificación de las periciales:

- **“Periciales documentadas con privilegio legal.** En el caso del procedimiento abreviado, la mera impugnación formal no impide su valoración, pues opera una identificación ope legis entre los informes emitidos por laboratorios oficiales sobre la naturaleza, cantidad y pureza de las sustancias estupefacientes cuando en ellos conste que se han realizado siguiendo los protocolos científicos aprobados por las correspondientes normas, y la prueba documental (art. 788.2 LECrim). La mera impugnación formal no impide su valoración, previa su introducción como prueba documental, sin necesidad de ratificación (Pleno no jurisdiccional de 25.5.2005).”
- **“Periciales preconstituidas, no precisan de ratificación si no son impugnadas materialmente, no bastando la mera impugnación formal.** Estas pericias comprenden pautas de asistencia, informes forenses, tasaciones practicadas por perito judicial, actas policiales, entendiéndose por tales aquellas actuaciones policiales objetivas e irrepetibles según denominación del Tribunal Constitucional que remite al art. 726 para su valoración (ATC. 26.9.2005 con cita AATC. 164/95 de 5 de junio y 393/90 y SSTC. 24/91 y 143/2005), y que comprende pautas de asistencia, informes forenses, tasaciones practicadas por perito judicial, actas policiales, entendiéndose por tales aquellas actuaciones policiales objetivas e irrepetibles (STC. 303/93 , recogida del cuerpo, los efectos o los instrumentos del delito, los croquis o fotografías levantados sobre el terreno o la misma comprobación de la alcoholemia). No precisan ratificación si no son impugnados materialmente, no bastando la mera impugnación formal.”
- **“Periciales documentadas con privilegio jurisprudencial consolidado.** El Pleno no jurisdiccional de la Sala Segunda de 21.5.99, punto 2, afirmó la innecesidad de ratificación del dictamen de los peritos integrados en organismos públicos, salvo que la parte a quien perjudique impugne el dictamen o interese su presencia para someterlos a contradicción en el plenario y lo hiciera en momento procesal oportuno. Es el caso de los informes científicos realizados por los especialistas de los Laboratorios oficiales del Estado, basados en conocimientos especializados, que no precisan de ratificación para ser valorados, salvo en caso de impugnación tempestiva y con contenido material (SS. 21.1.2005 en relación con informes lofoscópicos y de 27.11.2000 en cuanto a informes de Gabinete de Balística). Como justificación, se invoca la condición de funcionarios públicos de quienes los elaboran, la consiguiente presunción de imparcialidad, su especialización técnica, y adscripción a organismos dotados de los costosos y sofisticados medios propios en las modernas técnicas de análisis y la doctrina del Tribunal Constitucional en relación con la denominada “prueba preconstituida” (SSTS. 1.12.95, 6.6.96, 10.6.99, 28.6.2000, 16.4.2001, 31.1.2002, 25.1.2005, 31.1.2008, 1.6.2009).”
- **“Otras pericias, documentadas o no, sometidas a la necesidad de ratificación en el juicio oral. En cuanto a las exigencias del contenido de la impugnación, habrá que distinguir:**
- Periciales del art. 788.2 LECrim. Tesis estricta.

y pureza de sustancias estupefacientes cuando en ellos conste que se han realizado siguiendo los protocolos científicos aprobados por las correspondientes normas” a que se refiere el art. 788.2 LECrim.

Como explica DE LUCA⁸⁸ “además de estas normas generales, algunos principios particulares determinan la importancia y el valor de la prueba científica: la cualificación profesional del perito, el método observado, la claridad expositiva, la ausencia de contradicciones internas y externas y la racionalidad conclusiva... En definitiva, mediante la pericia, se trata de explicar una realidad que, por no ser obvia, necesita la interpretación del perito, la contradicción de las partes y finalmente la valoración del juez.”

El modo de ejecutar la pericia depende de cada caso concreto y en este sentido, algunos autores⁸⁹ indican que “los informes periciales deben estar rodeados de suficientes garantías de fiabilidad y no sólo en cuanto a su alcance o contenido, sino en cuanto a quienes los lleven a efecto no estén influenciados por condicionantes externos. Para ello se prevé la posible recusación de los peritos”.

Según FIGUEROA⁹⁰ “en nuestro ordenamiento procesal penal, como regla general, las pruebas inculpativas capaces de destruir la presunción de inocencia son las practicadas en el juicio oral. De ello se deriva que solo pueden considerarse auténticas pruebas las practicadas en dicha fase del proceso, donde culminan las garantías de publicidad, oralidad, inmediación y contradicción. La prueba pericial, en principio, no es una excepción. De acuerdo el principio de contradicción, para que los citados informes periciales puedan ser valorados como prueba de cargo, se requiere la presencia de los peritos en el acto de la vista, con el fin de ratificar el dictamen previamente elaborado e incorporado a los autos, así como para someterse al interrogatorio de las partes”.

La Sala 2ª del TS ha considerado que los dictámenes periciales realizados por organismos oficiales en la fase de Instrucción tienen carácter de prueba documental y pueden ser valoradas sin necesidad de ser reproducidas en el juicio oral, integrándose en el acervo probatorio al amparo de lo dispuesto en el art.726 de la LECrim, si bien quedando a salvo el derecho de la defensa a contradecir tales informes, bien solicitando la comparecencia de los peritos que los emitieron o proponiendo otros distintos para el acto del plenario. Así, la STS 3119/2011⁹¹, de 24 de mayo de 2011, según GIL VALLEJO⁹² resume didácticamente las teorías existentes al respecto de la impugnación y ratificación del dictamen pericial. En el proceso penal, igual que en el proceso

- No basta la mera impugnación por la Defensa: “La manifestación de la defensa consistente en la mera impugnación de los análisis sobre drogas elaborados por centros oficiales, no impide la valoración del resultado de aquellos como prueba de cargo, cuando haya sido introducido en el juicio oral como prueba documental, siempre que se cumplan las condiciones previstas en el art. 788.2 LECr. Las previsiones del art. 788.2 de la LECr son aplicables exclusivamente a los casos expresamente contemplados en el mismo” (Pleno de 25.5.2005).

Es posible no obstante, la impugnación solicitando la defensa otros informes de distintas entidades cualificadas, o de laboratorios particulares, si lo considerase oportuno, o incluso solicitando la comparecencia al acto del juicio oral de los que hayan participado en la realización de las operaciones que quedan plasmadas en el informe. En todo caso, deberá especificarse el órgano o laboratorio que interese practique la nueva pericia, pues en caso de solicitar simplemente “otra analítica por otro órgano” se entenderá que no hay verdadera impugnación (STS. 17.2.2009), si bien la limitada competencia para realizar, con carácter oficial, análisis de drogas, de acuerdo con los Tratados internacionales, no impide a la parte solicitar otra analítica, designando el Laboratorio correspondiente y asumiendo los gastos que la nueva analítica conlleve (SSTS. 15.1.2002, 21.7.2004 y 22.3.2006).

Debe precisarse el extremo impugnado y la razón de la impugnación (STS 29.6.2009) si se refiere a la competencia profesional del perito, a la necesidad e aclaraciones sobre la naturaleza de la droga, su peso o pureza, a la cadena de custodia, al método empleado etc... y los motivos específicos por los que cuestionan tales extremos”.

⁸⁸ DE LUCA, S., NAVARRO, F. y CAMERIERE, R. *La prueba pericial...* Op cit., pág. 19:4. Disponible en internet: <http://criminet.ugr.es/recpc/15/recpc15-19.pdf> [RECPC 15-19 (2013), 26 dic]

⁸⁹ MONTERO AROCA, J., GÓMEZ COLOMER, J.L., MONTÓN REDONDO, A., BARONA VILAR, S.: *Derecho Jurisdiccional III. Proceso Penal*, 12ª ed. Tirant lo Blanch., Valencia 2004, pág.318.

⁹⁰ FIGUEROA NAVARRO, Carmen: “Análisis Jurisprudencial sobre el valor probatorio de los informes periciales emitidos por los organismos oficiales: en especial la prueba científico-policial” en DOLZ LAGO, M.J. (Dir.) y FIGUEROA NAVARRO, C. (Coord.): *La prueba pericial científica*, Ed. Edisofer, Madrid, 2012., págs.184 y ss.

⁹¹ En este sentido la STS 3119/2011 de 24 de mayo: “... como se expresa en sentencia de esta Sala 1642/2000 de 23.10, son numerosos, reiterados y concordantes los precedentes jurisprudenciales de este Tribunal de casación que declaran la validez y eficacia de los informes científicos realizados por los especialistas de los Laboratorios Oficiales del Estado, que, caracterizados por las condiciones de funcionarios públicos, sin interés en el caso concreto, con altos niveles de especialización técnica y adscritos a organismos dotados de los costosos y sofisticados medios propios en las modernas técnicas de análisis, viene concediéndoseles unas notas de objetividad, imparcialidad e independencia que les otorga “prima facie” eficacia probatoria sin contradicción procesal, a no ser que las partes hubiesen manifestado su disconformidad con el resultado de la pericia o la competencia o imparcialidad de los peritos, es decir, que el Informe Pericial haya sido impugnado de uno u otro modo, en cuyo caso será preciso la comparecencia de los peritos al juicio oral para ratificar, aclarar o complementar su dictamen sometiendo así la prueba a la contradicción de las partes...”

⁹² GIL VALLEJO, Beatriz. “Naturaleza de la prueba pericial y la actuación del perito en el acto de juicio” *Diario La Ley*, N° 7818, Sección Doctrina, 14 de Marzo de 2012, págs. 5 y ss.

actual civil la validez de la prueba pericial no está condicionada a su ratificación, por lo que, en ausencia de impugnación el informe pericial formará parte de los medios de prueba, independientemente del valor que le otorgue al mismo el juzgador.

Que pueda no exigirse la comparecencia del perito en el acto de juicio parece contradecir los principios en materia de prueba. Sin embargo, dicha posibilidad ha sido avalada por el Tribunal Constitucional (STC 127/1990⁹³, de 5 de julio).

Según indica CARRASCO ANDRINO⁹⁴, respecto a la actuación de los peritos, la falsedad será más fácilmente constatable cuando se alteren los datos objetivos o relativos a las operaciones técnicas realizadas, o los resultados que de manera lógica tienen que deducirse de aquellos. Continúa la citada autora indicando que “suele considerarse que la apreciación de la falsedad en la parte valorativa resulta más compleja, ya que se entiende que entra dentro del terreno de las teorías o de la controversia científica. En este sentido será relevante si la técnica o el método empleado es o no el usado generalmente por la comunidad científica, cuál es su tasa de error, si es un método contrastado o no, si ha sido revisado o no por otros científicos, si viene o no avalado por publicaciones científicas, si existen opiniones eventualmente contrapuestas, etc. Se trata en definitiva de incidir sobre la fiabilidad de la prueba pericial, sometiendo a contradicción la calidad del conocimiento científico que se quiere traer al proceso.”

TARUFFO⁹⁵ refiere que “las pericias normalmente se vinculan con conocimientos específicamente científicos, pero que puede haber pericias que abarcan áreas de competencia técnica específica, que no son propiamente conocimiento científico.” Así, propone separar claramente qué es el conocimiento científico en un sentido amplio, para distinguir cuándo se está frente a un conocimiento especializado. “El conocimiento científico exige una investigación sistemática, controlada, empírica y crítica, demandando unas pruebas más estrictas para la comprobación o verificación de los diferentes resultados que genera. La prueba científica requiere un conocimiento más exacto de la realidad a partir de un método revisado para averiguarlo, pues sólo el conocimiento comprobado puede denominarse científico.”

Según GASCÓN ABELLÁN⁹⁶ Los grandes avances científicos y técnicos, sobre todo en la última década, han tenido un profundo impacto en el ámbito de la prueba. La lofoscopia, la ingeniería y la química son claros ejemplos del auge y posterior aplicación de los conocimientos científicos a la resolución de la casuística de interés policial y judicial. No obstante, donde más patentes y espectaculares han sido los avances es en el ámbito de la Biología molecular y concretamente en lo que se ha denominado Genética Forense.

Se puede por tanto, en relación con todo lo comentado hasta el momento, presentar como concepto de prueba pericial aquella actividad procesal, encomendada a especialistas y/o expertos cualificados, que se destina a complementar el conocimiento judicial en un determinado proceso, cuando este conocimiento sea concerniente a elementos científicos, artísticos o técnicos ajenos al ámbito estrictamente jurídico.

2. LA PRUEBA PERICIAL MICROBIOLÓGICA EN SUELOS

CHISUM y TURVEY⁹⁷, al referirse al principio de transferencia de LOCARD⁹⁸ explican que “*cuando dos objetos entran en contacto, siempre hay transferencia de material. Los métodos de detección pueden no ser lo*

⁹³ En la que se cita textualmente “*si bien la prueba pericial como es norma general en toda clase de prueba ha de ser practicada en el juicio oral, quedando así sometida a las garantías propias de la oralidad, publicidad, contradicción e intermediación que rigen tal acto, puede ocurrir que, practicada en trámite de instrucción, y conocida así por las partes al darles traslado de la causa para calificación, nadie propusiera al respecto prueba alguna para el acto de juicio, en cuyo caso, por estimarse que hubo una aceptación tácita ha de reconocerse aptitud a esas diligencias periciales para ser valoradas como verdaderas pruebas, máxime si han sido realizadas por un órgano de carácter público u oficial.*”

⁹⁴ CARRASCO ANDRINO, M^a. “*La falsedad en el dictamen pericial o en la traducción del intérprete en causa judicial*”. Cuadernos de política criminal... Op.cit, págs. 31 y 32.

⁹⁵ TARUFFO, M. “*La Prueba*”. Traducción de Laura Manríquez y Jordi Ferrer Beltrán. Madrid. Editorial Marcial Pons, 2008, pág. 277

⁹⁶ GASCÓN ABELLÁN, M. “*Validez y valor de las pruebas científicas: la prueba del ADN*”. Cuadernos Electrónicos de Filosofía del Derecho, 15 (2007), págs. 1 y 2.

⁹⁷ CHISUM, W., TURVEY, B.: “*Evidence dynamics: Locard's Exchange principle and crime reconstruction*, Journal of Behavioral Profiling”. Vol.1, núm. 1. Enero 2000, págs. 1 a 5.

⁹⁸ LOCARD, E. “*La police et les méthodes scientifiques*”. Editions Rieder, Paris, 1934. Pág.8 “*Toute action de l'homme, et a fortiori, l'action violente qu'est un crime, ne peut pas se dérouler sans laisser quelque marque*”. Traducido al Español significa “*Cualquier acción de un individuo, y obviamente la acción violenta que constituye un crimen, no puede ocurrir sin dejar rastros*”.

suficientemente sensibles para demostrar la transferencia, o la pérdida del material transferido puede desaparecer rápidamente con el tiempo. Sin embargo, la transferencia ha tenido lugar". Se pueden describir ejemplos reales, como el que a un sospechoso de un hecho delictivo se le hayan adherido a la suela de sus botas restos de tierra del lugar de la comisión del hecho, o que una pala utilizada para un expolio arqueológico o excavar un "zulo" que contenga explosivos procedentes de una organización terrorista, presente restos de tierra. En estos casos el cotejo pericial de suelos se constituye en una útil herramienta para la resolución de la investigación.

Según SANTILLANA⁹⁹ hoy en día son abundantes los laboratorios que realizan estudios de suelos y de cualquier material geológico con fines criminalísticos, entre los que destacan Reino Unido, Alemania, Canadá, Australia, Estados Unidos y Japón, considerándolos otro elemento de prueba más en una investigación policial. En España, pese a una tardía evolución, los laboratorios policiales ya realizan análisis de restos de suelos encontrados en el lugar de los hechos como consecuencia de una investigación criminal.

Dentro del análisis multidisciplinar de suelos, es objeto de esta Tesis estudiar en profundidad lo referente a la analítica microbiológica en suelos, aunque previamente **debe considerarse el contexto global en el que se desarrollan los análisis en la citada matriz analítica** y, al efecto, se procede a una revisión general de dichas analíticas con fines de contextualización de la prueba pericial microbiológica.

Principalmente, la mayoría de las muestras recogidas para cotejo, corresponden a sedimentos y partículas de suelo, en las cuales es más factible su transferencia entre objetos. Estas muestras indiciarias de material geológico pueden ser clasificadas en siete grupos: (1) rocas, (2) sedimentos, (3) suelos, (4) polvo, (5) minerales, (6) fósiles y (7) partículas.

Hay dificultades en la estandarización del estudio del suelo con fines criminalísticos, ya que se ha de afrontar dicho estudio desde un punto de vista multidisciplinar en el que influyen propiedades mineralógicas, físicas, químicas, biológicas (consideremos microbioma, trazas zoológicas y restos vegetales) y bioquímicas del suelo.

Por otro lado, y teniendo en cuenta el ya mencionado principio de LOCARD, hemos de distinguir entre dos tipos de transferencias: 1) *La transferencia primaria o directa*, que ocurre, por ejemplo, al adherirse tierra a los zapatos que pisan una determinada zona de suelo; y 2) *la transferencia secundaria o indirecta*, que se produce por cualquier movimiento posterior de ese material (siguiendo con el ejemplo, cuando la tierra de los zapatos se desprende en la alfombra de un vehículo).

Esta transferencia secundaria de materiales, también puede ser importante en la evaluación de la naturaleza y fuente (s) de contacto¹⁰⁰. Hoy día sedimentos y suelos se estudian en el proceso penal como una prueba pericial más que es presentada ante los tribunales de justicia, ya que son muchos los actos delictivos (homicidios, violaciones, robos, terrorismo...) en los que tiene lugar la transferencia entre muestras de suelos y diversos materiales, como zapatos, ruedas y bajos de vehículos, herramientas, etc.

2.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y CADENA DE CUSTODIA

El objeto de la pericia suelen ser vestigios recogidos directamente por la policía judicial en el lugar donde se cometió el delito. Así se expone, entre otras, en la STS (Sala Segunda) 1190/2009¹⁰¹, de 3 de diciembre "*La Policía Judicial tiene por imperativo constitucional, art. 126, la averiguación del delito y el descubrimiento del delincuente, esto es, le corresponde la práctica de los actos de investigación pertinentes para el descubrimiento del hecho punible y de su autoría, y para la efectividad de este cometido está facultada para la recogida de efectos, instrumentos o pruebas que acrediten su perpetración como expresamente se recoge en el art. 282 de la LECrim que expresamente faculta a la Policía Judicial para "recoger los efectos, instrumentos o prue-*

⁹⁹ SANTILLANA REYES, E.J.: "Análisis criminalístico de suelos", en IBÁÑEZ PEINADO, J. (Coord.): *Técnicas de Investigación Criminal*, Dykinson, 2ª ed., Madrid, 2012, págs. 638 y 639.

¹⁰⁰ FITZPATRICK, R.W. "Soil: Forensic Analysis", Wiley Encyclopedia of Forensic Science, United Kingdom, 2009, págs. 2377 y ss.

¹⁰¹ Extracto STS 1190/2009: "*En tal sentido pueden citarse las sentencias de esta Sala de 7.10.94, 9.5.97 y 26.2.99, 26.1.2000, que recuerdan que los arts.326 y 22 LECrim se han de poner en relación con los arts 282 y 786.2 (actual art. 770.3) del mismo Texto Legal y con el Real Decreto 769/87 de 17.6, regulador de la Policía Judicial, de cuya combinada aplicación se puede llegar a establecer que la misión de los funcionarios policiales se extiende a la recogida de todos los efectos, instrumentos o pruebas del delito de cuya desaparición hubiera peligro, poniéndolos a disposición de la autoridad judicial. Estimación que no quebranta el art. 326 LECrim. ni se causa indefensión, por el hecho de que los vestigios hallados por los especialistas en identificación, sean remitidos a los respectivos Gabinetes científicos.*"

bas del delito de cuya desaparición hubiere peligro, poniéndolos a disposición de la Autoridad Judicial”. Se trata en todo caso, de actos de investigación policial que los arts. 282 y 770.3 LECrim atribuyen a la Policía Judicial y el art. 11.1 g de la LO. 2/86 otorga a los Cuerpos y Fuerzas de seguridad. El descubrimiento y recogida de objetos para su ulterior examen en busca de huellas, perfiles genéticos, restos de sangre, etc... son tareas que exigen una especialización técnica de la que gozan los funcionarios de la Policía científica a los que compete la realización de tales investigaciones, sin perjuicio de que las conclusiones de las mismas habrán de acceder al Juzgador y al Tribunal sentenciador para que, sometidas a contradicción puedan alcanzar el valor de pruebas”.

Se ha de mencionar específicamente la **cadena de custodia** como la metodología de aseguramiento de “los efectos, instrumentos o pruebas del delito de cuya desaparición hubiere peligro, poniéndolos a disposición de la Autoridad Judicial” que preceptúa el art. 282 de la LECrim. FIGUEROA¹⁰² define la cadena de custodia como “el procedimiento documentado que garantiza la identidad, integridad y autenticidad de los restos y vestigios relacionados con los hechos objeto de la causa, de forma ininterrumpida desde su hallazgo hasta su aportación al proceso, siempre a disposición de la autoridad judicial competente”.

Como indican especialistas de la Red Forense Europea ENFSI¹⁰³, la recolección, empaquetado y manejo de las muestras de animales, plantas, hongos y suelos para análisis molecular requiere los mismos estándares que la investigación de cualquier incidente. La integridad de los indicios y la trazabilidad de las muestras (por ejemplo, cadena de custodia) se necesitan para asegurar que el desarrollo del caso no se vea comprometido como resultado de procedimientos impropios de manejo. Respecto a la cadena de custodia, la estrategia de su cuestionamiento sistemático, por parte de la defensa, no debe ser utilizada como un medio para desmontar una investigación y, en ese sentido, indica LADRÓN TABUENCA¹⁰⁴: “a la vista de lo afirmado por el Tribunal Supremo podríamos sacar una primera conclusión sobre el hecho de que no sería suficiente que cualquier abogado defensor dijera que no se ha cumplido la cadena de custodia, si no que debería demostrar en qué aspecto concreto no se ha asegurado la misma...”

El Tribunal Supremo, en su reciente STS 320/2015¹⁰⁵ (Sala Segunda), de 27 de mayo, señala que “...Se quiere garantizar que lo que se ocupó es lo que se analiza y que no se han producido alteraciones, manipulaciones o sustituciones, bien intencionadas, bien por desidia o descuido. Para evitarlo se establecen cautelas y en ocasiones unos protocolos. En todo caso esta Sala tiene declarado que no se trata de un problema de validez de la prueba sino de fiabilidad”.

En ese sentido señala FIGUEROA¹⁰⁶ la necesidad de garantizar la cadena de custodia de las fuentes de pruebas del delito investigado, con el fin de acreditar que lo que se somete a juicio del Tribunal es lo mismo que fue aprehendido en el marco de la investigación criminal y analizados en los laboratorios competentes, pudiendo afirmarse su autenticidad e indemnidad. Al efecto, se establece un protocolo de cadena de custodia que tiene por objeto estandarizar, en el seno de todo el proceso penal, las pautas de actuación y cautelas necesarias que deben adoptarse en el recorrido que siguen los vestigios, desde su hallazgo y recogida, en el lugar de los hechos o en el cuerpo de la víctima y/o de las personas relacionadas; y su remisión para la práctica del correspondiente

¹⁰² FIGUEROA NAVARRO, C.: “El aseguramiento de las pruebas y la cadena de custodia”, La Ley Penal, nº84, Julio 2011, pág.4.

¹⁰³ BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTILLANA, E.J.; STAGINUS, C. “Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for Forensic Examination of Non Human Biological Traces”. ENFSI-BPM-APS-01. Versión 1. Noviembre 2015. Publicado 08/06/2016: <http://www.enfsi.eu/documents/best-practice-manuals>, págs. 20 y 21.

¹⁰⁴ LADRÓN TABUENCA, P. “La cadena de custodia en el proceso penal español: revisión normativa”; en FIGUEROA NAVARRO, C. (Dir) “La cadena de custodia en el proceso penal”. Edisofer, Madrid, 2015, pág.25. En este sentido explica: *no compartimos a este respecto la posición mantenida con frecuencia en las resoluciones judiciales que se pronuncian en el sentido de exigir a la parte que alega la ruptura de la cadena de custodia la carga de probar que efectivamente se produjo tal ruptura en algún momento. Tal interpretación, a nuestro juicio, resulta contraria al principio de normalidad probatoria o de mayor facilidad de acceso a la fuente de prueba. Principios que deberían conllevar como consecuencia necesaria, por el contrario y a nuestro parecer, la inversión de carga de la prueba, en el sentido de que fueran los organismos encargados de la práctica de la prueba pericial quienes hubieran de acreditar su actuación con pleno respeto a la lex artis y a los específicos protocolos de actuación, tanto puramente orgánicos como científicos.*

¹⁰⁵ Ver también STS: 777/2013 de 07 de octubre. Cuando consta la autenticidad de la muestra por otras fuentes es irrelevante cualquier eventual irregularidad en la cadena de custodia. Estamos ante un problema de fiabilidad y no de validez o licitud probatoria.

¹⁰⁶ FIGUEROA NAVARRO, C. (Dir.): *La cadena de custodia en el Proceso Penal*, Madrid, 2015, págs. 13,14 y ss. En el mismo sentido, se pronuncia el Tribunal Supremo en su sentencia 587/2014, de 18 de julio al manifestar que «la cadena de custodia constituye una garantía de que las evidencias que se analizan y cuyos resultados se contienen en el dictamen pericial son las mismas que se recogieron durante la investigación criminal, de modo que no existan dudas sobre el objeto de dicha prueba pericial».

análisis a los Laboratorios designados, hasta su presentación como medios probatorios en el acto de juicio oral y posterior conservación, devolución o destrucción.

Por parte de los laboratorios oficiales se han dado pasos encaminados a dotar a todo el personal que realice recogida de indicios¹⁰⁷ o muestras por cualquier motivo de un documento que asegure, dé fiabilidad, a la cadena de custodia de las mismas en su recogida y posterior remisión a los laboratorios para su estudio, así como hasta la confección del correspondiente informe pericial. Este documento explícito existe particularmente en las unidades de Guardia Civil¹⁰⁸, por lo que es posible realizar un seguimiento de los pasos que se han dado para hacer llegar los vestigios¹⁰⁹ y muestras al laboratorio y qué ha ocurrido con ella una vez allí.

En este sentido la acreditación bajo la norma ISO 17.025 es el proceso de estandarización que implementa un sistema que cumple con todos esos requisitos. Es muy importante conocerlos para establecer el control y supervisión permanente de los mismos. Si tenemos en cuenta la definición dada anteriormente para la cadena de custodia, las actividades que pueden verse sometidas a supervisión por la normativa ISO serían:

- La toma de indicios/muestras realizada en el marco de una inspección ocular¹¹⁰.
- La identificación de todos y cada uno de los indicios/muestras que hayan sido recogidos, así como su correcto empaquetado individualizado. (ISO/IEC 17020:2012)
- El transporte y remisión al lugar de destino que se haya designado en función la naturaleza del indicio/muestra o de los ensayos a realizar. (ISO/IEC 17020:2012)
- La extracción de muestras y su manipulación durante todas las fases del análisis al que hayan sido sometidas cuando se precise realizar un estudio sobre las mismas. (UNE-EN-ISO 17.025)
- La adecuada conservación de las muestras en todas las fases: antes, durante y después de su estudio. (UNE-EN-ISO 17.025)
- La devolución de los indicios/muestras sobrantes a las Autoridades peticionarias.(UNE-EN-ISO 17.025)

2.2. LA PRUEBA PERICIAL MICROBIOLÓGICA DE SUELOS: ESTUDIO Y DERECHO COMPARADO

2.2.1. La prueba pericial de suelos en España. Estudio microbiológico de suelos en el Servicio de Criminalística de la Guardia Civil

Según indica CORDERO¹¹¹, desde la formulación del principio de intercambio por LOCARD, muchos han sido los descubrimientos científicos y los avances tecnológicos que han hecho posible el desarrollo de la criminalística. En este sentido, el equipo de peritos del Laboratorio de Medio Ambiente del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil, se planteó la posibilidad de cotejar los restos de suelo obtenido de unos zapatos u otras prendas y efectos del sospechoso de un crimen con el suelo donde se hallase la víctima. Para afrontar dicha pericia, como más adelante se verá, es necesario realizar análisis geoquímicos y botánicos. Dentro de ellos, se realizan estudios de textura, granulometría, color, composición química, mineralogía, morfología (mediante microscopía electrónica de barrido) de minerales así como distintas trazas de vegetales, y un largo etc., mediante los cuales se pueden cotejar dos muestras de suelo de las que se pida su análisis comparativo. Sin embargo, dos muestras de suelo, aparentemente similares, pueden al final no ser ni parecidas.

¹⁰⁷ Orden **JUS/1291/2010. Artículo 49.** Estudio de **indicios**. Normas generales de actuación. Se considera **indicio a todo material biológico o no biológico**, objeto o fragmento que pueda encontrarse en el lugar de los hechos, sobre la víctima o sobre un sospechoso y de cuyo estudio pueda llegar a establecerse una evidencia en la reconstrucción del suceso.

¹⁰⁸ En el caso del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, la Orden **JUS/1291/2010**, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses

¹⁰⁹ **Vestigios** del delito son las huellas y restos materiales que quedan del delito. Los vestigios que se obtengan constituyen piezas de convicción y participan de la naturaleza, tratamiento jurídico y efectos del conjunto de ellas. A efectos de pericial científica se asimila al término indicio.

¹¹⁰ En el caso de inspecciones oculares es de aplicación la norma **ISO/IEC 17020:2012** Evaluación de la conformidad. *Requisitos para el funcionamiento de diferentes tipos de organismos que realizan la inspección.*

¹¹¹ CORDERO PÉREZ, J.C.: “Análisis criminalístico de suelos (I). La aportación de la microbiología a la prueba pericial”, en IBÁÑEZ PEINADO, J. (Coord.): *Técnicas de Investigación Criminal*, 2ª ed., Dykinson, Madrid, 2012, págs. 35 a 37.

Por esta razón, el Laboratorio de Medio Ambiente del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil desarrolló métodos adecuados para el análisis de muestras de suelos, donde era necesario un equipo multidisciplinar¹¹². CORDERO ¹¹³ advirtió que el estudio genético de las poblaciones bacterianas podría ser útil en el estudio de suelos y, en consonancia con otro tipo de definiciones, propuso la de Microbiología Criminalística, definiéndola como “la aplicación de la metodología científica referida al análisis microbiológico en la resolución de un hecho delictivo”.

Para proponer esta definición, el autor se ampara en tres hipótesis, que deben considerarse como requisitos que conduzcan al establecimiento del estándar de la prueba:

1. El principio de transferencia es aplicable a los microorganismos.
2. Se ha de disponer de metodología adecuada para caracterizar los microorganismos aislados de las muestras.
3. La comparación entre cepas y/o poblaciones microbianas ha de ser significativa.

El estudio de la ecología microbiana desde el punto de vista genético es la herramienta que caracteriza a las comunidades bacterianas para su aplicación en el estudio criminalístico de suelos, ya que las poblaciones de las diferentes especies que constituyen esas comunidades, como indica el mencionado autor, cumplen las siguientes premisas:

1. Las poblaciones bacterianas están adaptadas a las condiciones bióticas y abióticas locales. Dichas condiciones pueden fluctuar durante las estaciones y mediante severos cambios ambientales.
2. Normalmente ocurre que dichas poblaciones son estables dentro de periodos temporales relativamente pequeños.
3. Sin embargo, nos encontramos con especies de microorganismos que son persistentes durante periodos de tiempo muy elevados y que además son susceptibles de adaptarse a las fluctuaciones mencionadas. Esto es debido a su capacidad de crear formas de resistencia latentes (esporas).

Por lo tanto se ha de considerar al suelo como el nicho ecológico de comunidades bacterianas características constituidas por determinadas especies concretas en un tiempo concreto. Sin embargo, las especies capaces de crear formas de resistencia frente a condiciones desfavorables se intuían como candidatas para la realización de los estudios, ya que su carácter de persistentes puede hacerlas susceptibles de ser valoradas en el proceso judicial. Esta fue la clave para poder realizar comparaciones entre las diferentes muestras obtenidas en la investigación. El análisis microbiológico de suelos, mediante técnicas de genética molecular en investigación forense, fue propuesto por HORSWELL¹¹⁴ como prueba científica para determinar la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen.

Según SANTILLANA¹¹⁵, el estudio criminalístico de suelos consiste en un cotejo entre la muestra dubitada o muestra problema, que está relacionada directamente con la escena del crimen y de la que desconocemos su origen, y la muestra de suelo indubitada o muestra control, recogida por el investigador en una localización geográfica, donde conocemos la hora y la fecha de la toma. Esta toma está relacionada con la escena del crimen o con una zona que el sospechoso haya indicado.

La muestra problema, procedente del sospechoso, suele estar adherida a zapatos, vehículos, utensilios o cualquier otro material en la que se puedan recoger restos de suelo como consecuencia de una transferencia. En muchas ocasiones, esta muestra es de pequeño tamaño, por lo que el investigador debe valorar qué grado de representatividad presenta respecto a su origen, ya que no se puede esperar que sea exactamente igual que una muestra indubitada o muestra control.

¹¹² SANTILLANA REYES, E.J.: “Análisis criminalístico de suelos... en IBÁÑEZ PEINADO, J. (Coord.).... op.cit, págs. 639 y 640. Para el estudio de suelos el laboratorio se divide en dos áreas de trabajo: una geoquímica, donde se realiza un estudio de características físicas, químicas, mineralógicas y granulométricas; y otra biológica, donde se realiza un estudio morfológico de trazas vegetales y estudio genético de las comunidades bacterianas procedentes del suelo.

¹¹³ CORDERO PÉREZ, J.C.: “Análisis...”...Op.cit, págs. 37 a 39.

¹¹⁴ HORSWELL, J. et al.: “Forensic Comparison of Soils by Bacterial Community DNA Profiling” en Journal of Forensic Sciences, 2002, nº 47, págs. 350 a 353.

¹¹⁵ SANTILLANA REYES, E.J.: “Análisis criminalístico...”, Op. cit, págs. 638 y 639.

FITZPATRICK¹¹⁶ explica que en el muestreo de suelos que se realiza con fines de investigación criminal se busca el grado de similitud entre la muestra dubitada y la recogida en la escena del crimen (indubitada), por lo que se deben tomar muestras al azar en puntos del interior de la escena del crimen o en las inmediaciones. Así, si tenemos huellas de pisadas, se tomarán en la propia huella y alrededor de ésta. También hay que tener en cuenta que se puede realizar un muestreo en profundidad o superficial, el cual dependerá de las circunstancias del contacto entre el soporte del sospechoso (zapatos, ruedas de vehículos, etc.), la geología y la formación de los suelos de la escena del crimen.

Como explica SANTILLANA¹¹⁷, el tipo y el tamaño de muestras que hay que tomar dependen de las características del suelo, de la actividad en el escenario del crimen y del tipo de contacto entre la muestra indubitada (ej. zapato) y dicho escenario, además de la cohesión de la estructura del suelo. El autor propone unas directrices respecto **a la toma de muestras de suelo**:

- Generalmente:
 - ▷ Sedimentos de grano fino: 150 gr. seco.
 - ▷ Grano grueso o materiales heterogéneos: 500 gr. (> arena gruesa).
 - ▷ Muestras de 2gr. o menos pueden ser suficiente para distintos análisis (en el caso de análisis genético **bacteriano** esa cantidad oscila **entre 250 mg -1000 mg** dependiendo de la técnica utilizada).
- Cotejo de muestras de calzado:
 - ▷ 0-1 cm. cuando el contacto con el suelo de la escena del crimen ha sido superficial.
 - ▷ 0-5 cm. cuando el calzado presenta abundante barro como consecuencias de que el suelo se encuentra húmedo.
- Zanjas o fosas: intervalos regulares en profundidad (ej. 0 a 5 cm.).
- Suelos cohesionados. Mediante cuchillo o espátula se harán los cortes necesarios para obtener bloques, los cuales pueden ser estudiados detenidamente en el laboratorio.
- Recogida de vegetación. Las muestras comparativas de vegetación deben abarcar todos los tipos de plantas de la zona pertinente, así como los fragmentos que el viento haya podido desplazar hasta dicha zona.

Las muestras de suelo dubitadas procedentes de zapatos, bajos de vehículos, herramientas, etc., y que presenten compactación, no deben en ningún caso romperse debido a que, como indica SANTILLANA¹¹⁸, con independencia de que normalmente presentan varias capas sólo una es relevante, es decir, la forma en la que se ha producido la sedimentación puede ser por sí misma de interés para la investigación. Para la toma de la muestra en el caso de portadores no transportables, se aplica el principio de no utilizar nunca láminas adhesivas, sino que hay que recoger cuidadosamente el material (ej. espátulas). En el caso de ropas, se puede remitir la ropa al laboratorio para la extracción del suelo adherido o se puede sacudir sobre hojas de papel limpias.

En cuanto **a la conservación** de las muestras, el autor propone, como regla general:

- Las muestras deben ser llevada lo más rápidamente al laboratorio para su análisis.
- Si no es posible, conservar en oscuridad y en nevera (evitamos cambios como consecuencia de la actividad microbiana u oxidación).
- No se debe congelar, ya que puede afectar a las propiedades físicas del suelo y pueden cambiar las cantidades de materia orgánica. En el caso de requerirse análisis genético bacteriano sí hay que congelar (-80°C para almacenamientos de gran duración).
- Preferible no secar las muestras hasta el laboratorio, donde se observará la muestra y se tomarán en caso necesario las sub-muestras necesarias.

¹¹⁶ Cfr. FITZPATRICK, R.W., RAVEN, M.D. "How pedology and mineralogy helped solve a double murder case: Using forensics to inspire future generations of soil scientists", 2012. Disponible en: <https://www.soils.org/publications/sh/articles/53/5/14>. El objetivo del análisis forense del suelo es asociar una muestra de suelo dubitada tomada de un elemento, como una pala, vehículo, zapatos o ropa, con una muestra de suelo de una ubicación específica conocida.

¹¹⁷ SANTILLANA REYES, E.J.: "Análisis criminalístico..." *Op.cit.*, págs. 638 y 639.

¹¹⁸ SANTILLANA REYES, E.J.: "Análisis criminalístico..." *Op. cit.*, págs. 638 y 639.

- Las muestras vegetales hay que analizarlas lo más rápidamente posible por su deterioro. Si no es posible, mejor utilizar papel secante y presionar, como hacen los botánicos.

Como indican algunos autores¹¹⁹, desde el punto de vista geoquímico los materiales del suelo pueden ser asimilados a indicios por los siguientes seis motivos:

1. El suelo presenta interés identificativo o biunívoco de la muestra, puesto que hay un número casi infinito de tipos de suelo diferentes, y los suelos pueden cambiar rápidamente en muy cortas distancias tanto horizontalmente como verticalmente, permitiendo a los examinadores forenses distinguir entre muestras de suelo.
2. Los materiales de suelo son fácilmente descritos y caracterizados por el color y usando varios métodos analíticos como el XRD (mineralogía) y espectroscopia (química).
3. El suelo tiene una fuerte capacidad de trasladarse y adherirse, sobre todo la arcilla fina.
4. A diferencia de las transferencias más obvias de colores brillantes como la sangre, manchas de barra de labios y pintura, el suelo es casi invisible. Los materiales finos de suelo, sobre todo cuando impregnan la alfombra de un vehículo, zapatos o ropa, a menudo no son visibles a simple vista; y, normalmente, un sospechoso no se esforzará en quitarlos.
5. Los materiales de suelo son fácilmente localizados y recogidos usando lentes de mano o microscopios ópticos al inspeccionar las escenas del crimen o examinar elementos de prueba física.
6. Las bases de datos automatizadas nacionales e internacionales de los datos de perfiles de suelo y mapas, son fácilmente accesibles por la policía o los científicos de suelo a través de Internet. Por ejemplo, Australian Soil Resources Information System (ASRIS), permite producir un mapa de suelos descargando información directamente de Internet (www.asris.gov.au)¹²⁰.

En España, análogamente, el SEISnet¹²¹ centraliza el trabajo realizado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidades respecto a clasificación y características de los suelos.

Casos de gran notoriedad como el que realizó LOMBARDI¹²² en el caso del secuestro y posterior asesinato del Primer Ministro italiano Aldo Moro, han contribuido al reconocimiento general de que el suelo como prueba física puede hacer importantes contribuciones a la investigación criminal, como el que realizaron SANTILLANA CORDERO Y ALAMILLA¹²³, con muestras procedentes del expolio de un yacimiento arqueológico. Actualmente, como indica DAWSON¹²⁴, el análisis pericial de suelos se emplea, generalmente, sólo en casos de delitos graves, a pesar de poder ser usados en la fase de investigación de muchos casos menos graves. Sin embargo, como proponen BARCLAY Y DAWSON¹²⁵, hay una oportunidad para el desarrollo de un enfoque forense que permita un mayor uso de la información de los suelos, tanto en la fase de información de las operaciones de la policía, como en la fase probatoria.

En este contexto, las comparaciones de muestras de suelo pueden ser utilizadas no sólo para asociar sino también para eliminar las zonas de tierra y/o sospechosos de las investigaciones de la policía, permitiendo así la reasignación de recursos limitados.

¹¹⁹ FITZPATRICK, R.W., RAVEN, M.D., FORRESTER, S.T.: "A systematic approach to soil forensics: Criminal case studies involving transference from crime scene to forensic evidence", en RITZ, K., DAWSON, L., MILLER, D.: *Criminal and environmental soil forensics*, The Netherlands, 2009, págs.105 y ss.

¹²⁰ JOHNSTON, R.M., BARRY, S.J., BLEYS, E., BUI, E.N., MORAN, C.J., SIMON, D.A.P., CARLILE, P., MCKENZIE, N.J., HENDERSON, B.L., CHAPMAN, G., IMHOFF, M., MASCHMEDT, D., HOWE, D., GROSE, C., SCHOKNECHT, N.: "ASRIS: The data base", Australia, 2003.

¹²¹ SEISnet "Sistema español de información de suelos sobre internet" presenta datos transferidos por el CSIC <http://evenor-tech.com/banco/seisnet/seisnet.htm>

¹²² LOMBARDI, G. J.: "The Contribution of Forensic geology and Other Trace Evidence Analysis to the Investigation of the Killing of Italian Prime Minister Aldo Moro". *Forensic Science International*, nº 44, 1999, pág.634.

¹²³ SANTILLANA REYES, E.J.; CORDERO PÉREZ, J.C.; ALAMILLA, F.: "Forensic Soil Analysis: Case Study of looting at a Roman-Visigothic Burial Vault". Capítulo 4 en *Soil in Criminal and Environmental Forensics* (Proceedings of the Soil Forensics Special, 6th European Academy of Forensic Science Conference, The Hague). Kars- van den Eijkel (The Netherlands), Springer International Publishing Switzerland, 2016.

¹²⁴ DAWSON, L.A., HILLIER, S.: "Measurement of soil characteristics for forensic applications", Wiley Interscience, 2010. Disponible en: <https://people.ok.ubc.ca/orcac/soil%20characteristics.pdf>

¹²⁵ BARCLAY, A. D., DAWSON, L. A., DONNELLY, L. J., MILLER, D. R., RITZ, K.: *Criminal and Environmental Soil Forensics*, London, 2009, pág. 501.

2.2.1.1. Examen preliminar de las muestras de suelo

Generalmente, el examen del suelo, desde el punto de vista geoquímico, comienza con una comparación visual y un análisis microscópico, que reúne información sobre características tales como la estructura, la textura, el contenido de la materia orgánica y el color. Por regla general, se utiliza un microscopio binocular estereó para examinar cuidadosamente la muestra de suelo e identificar y registrar cualquier objeto ajeno a la muestra, como fibras, metales, pintura, cristal y plásticos. En este sentido, SUGITA Y MARUMO¹²⁶ sugieren que la microscopía sigue siendo la técnica inicial más útil.

La identificación de las diferencias del suelo usando en conjunto varios atributos morfológicos como el color, la consistencia, la textura y la estructura, es el primer paso para usar la información de las muestras de suelo con el fin de ayudar a los investigadores policiales en escenas del crimen.

Según exponen algunos autores¹²⁷, la toma de muestras de un suelo es un problema complejo debido a la variabilidad de los mismos; ello hace difícil establecer un método totalmente satisfactorio para todos los casos en la toma de muestras. Dichos autores consideran que algunos procedimientos utilizados en la edafología (muestreo al azar o el sistemático por cuadrículas, que conllevan mezclar submuestras para conformar las muestras que van al laboratorio) no son aplicables para conducir una investigación de índole forense (debido a ese proceso de mezcla previo).

Según Dávila¹²⁸, si en un caso en el que en la escena del crimen se encontraran pisadas de zapatos que tenían rastros de tierra, estando cerca de un jardín, el investigador, hace un muestreo al azar con la muestra ya recolectada, destruiría las propiedades particulares de esa tierra, de la pisada, al mezclarlas con las del jardín, pues pudiera ser que las propiedades físicas y químicas de ésta difieran con las de aquella provocando que el ulterior cotejo de las muestras de tierra de pisadas en un laboratorio no coincida con las muestras indubitadas (si se tuviesen), pues se alterarían propiedades del suelo como su color, su textura, su humedad, su pH, etc.

2.2.1.2. El análisis de tierra y sedimentos de un molde de huella de zapatos

La rutinaria producción de moldes de huellas de zapatos tomados del suelo proporciona mucha información, además de la talla de zapatos y el modo de andar. El material adherido a la superficie del molde representa la conservación del momento de la impresión de la huella. El análisis de la interfaz entre el molde y el suelo es por lo tanto, una fuente potencialmente lucrativa de información para la reconstrucción forense¹²⁹.

2.2.2. La prueba pericial microbiológica de suelos en derecho comparado

Como ya se ha mencionado, el valor del suelo como prueba deriva del predominio y transferibilidad: la muestra de suelo puede ser encontrada en los zapatos del sospechoso, ropas, vehículo, etc., y puede ser transferido de o a la escena del crimen.

Algunos autores¹³⁰ indican que, al contrario que la “huella digital” del ADN, que puede proporcionar una tasa de error absoluta a la correspondencia de la muestra, la huella digital genética de suelo no puede proporcionar una prueba definitiva relacionando al sospechoso o víctima con la escena del crimen.

¹²⁶ SUGITA, R., MARUMO, Y.: “Principles, Techniques and Applications”, Forensic Geoscience, London, 2004, pág.97.

¹²⁷ SORIANO, M^a. D.; SANCHO CIVERA, J.; VERDÚ BELMONTE, A. “Práctica de Diagnóstico y Fertilidad de Suelos”. Universidad Politécnica, Valencia, 2004, pág. 5.

¹²⁸ DÁVILA VILLEGAS, M.J.: “Procedimientos de análisis de suelos en una investigación criminal. Segunda Parte: Análisis y Experimentos”, disponible en: http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_15_QUI02.pdf

¹²⁹ BULL, P.A, PARKER, A., MORGAN, R.M. “El análisis de tierra y sedimentos de un molde de huella de zapatos”, en *Forensic Science International*, 2006, Oct. 16; 162 (1-3):6 y ss.

¹³⁰ PASTERNAK, Z., ASHRAF, A., GATICA, J., GAFNY, R., AVRAHAM, S., FRENK, S., MINZ, D., GILLOR, O., JURKEVITCH, E.: “Optimization of molecular methods and statistical procedures for forensic fingerprinting of microbial soil communities”, *International Research Journal of Microbiology*, Vol.3 (11), Noviembre 2012, págs. 363 y ss. Disponible en: <http://www.interesjournals.org/IRJM>

Asimismo, cabe destacar que los datos forenses basados en el ADN humano son usados en gran parte en los tribunales alrededor del mundo y han desempeñado un papel principal en numerosos juicios¹³¹. Al contrario, el uso del ADN bacteriano del suelo con finalidades forenses no es un procedimiento muy rutinario¹³².

Tal y como señalan HOPKINS, WILTSHIRE y TURNER¹³³: una muestra de suelo puede constituir una prueba física que conecta a las personas con determinadas ubicaciones geográficas. En una investigación criminal, como la que a continuación se especifica, la información proporcionada por la prueba pericial microbiológica de suelos puede ser crucial para la resolución de la investigación.

En el caso que se muestra en esta determinada investigación, realizada en Israel¹³⁴, se detalla la escena del crimen, cómo se recogen las muestras del suelo y cómo finalmente y mediante un análisis de la comunidad microbiana, se relaciona al sospechoso con el lugar de los hechos:

2.2.2.1. Escena del crimen (Israel)

Una mujer joven fue encontrada muerta apuñalada en las orillas del Río Yarkon en Tel-Aviv. No se encontraron huellas, armas u otro tipo de pruebas físicas en la escena de delito. El principal sospechoso, detenido un par de días más tarde, afirmaba haber estado con la víctima en un aparcamiento no asfaltado, cercano (área de la coartada). El sospechoso había lavado su ropa y zapatos después del asesinato y la única posible conexión a la escena de delito era una pequeña muestra de suelo (0.2 g) encontrado dentro de su zapato.

2.2.2.2. Muestras de suelo (Israel)

Se recogieron muestras de suelos de ubicaciones diferentes. La muestra de suelo utilizada para la evaluación de los protocolos de extracción de ADN fue tomada a 5 cm debajo de la superficie y se mantuvieron en hielo hasta su utilización. Las muestras provenientes de la escena del crimen fueron guardadas en bolsas de plástico en el estante y en la oscuridad por 6 meses hasta el análisis. La muestra de suelo del zapato del sospechoso no fue puesta a disposición para el análisis por el tribunal debido a la naturaleza destructiva de dicho análisis.

Las muestras de suelo fueron tomadas en varios sitios de la escena del crimen y sus alrededores, en el área de la coartada y cerca del aparcamiento familiar en la casa del sospechoso principal. En algunos casos forenses, la cantidad de material recogido es tan pequeña que no se puede obtener la réplica de las muestras. En este sentido, y para reflejar esta situación, el análisis presentado fue realizado sin conocimiento previo del origen de las muestras, y con una sola réplica por sitio.

Por lo tanto, para simular la cantidad encontrada en el zapato del sospechoso, estando ésta no disponible, se extrajo ADN de todas las muestras. Se analizaron las muestras provenientes de la escena del crimen, de la escena de la coartada, de la casa del sospechoso y de sitios geográficos diferentes en Israel en una prueba ciega. Se obtuvieron resultados concluyentes al relacionar la muestra de la casa del sospechoso con la muestra de la escena del crimen.

2.2.2.3. Recomendaciones de procedimiento (Israel)

Para una evaluación en profundidad del planteamiento se debe tener en cuenta lo siguiente¹³⁵:

- a) Siempre que sea posible, hay que recoger muestras tan pronto como el delito sea descubierto, se debe recuperar todo el material posible de los lugares de investigación, incluidos los suelos de diferentes profundidades y diferentes posiciones en y cerca de la escena del crimen, y en esferas no relacionadas.

¹³¹ JOST, K.: *Does expanding them threaten civil liberties?* DNA databases, 1999, The CQ Researcher 9. págs. 449 y ss.

¹³² HORSWELL, J. et al.: *"Forensic Comparison..."* Op. cit, págs.350 a 353.

¹³³ HOPKINS, D.W., WILTSHIRE, P.E.J., TURNER, B.D.: *"Microbial characteristics of soils from graves: an investigation at the interface of soil microbiology and forensic science"*, en Appl. Soil Ecol. 14(3), 2000, págs. 283 y ss.

¹³⁴ LERNER, A., SHOR, Y., VINOKUROV, A., OKON, Y., JURKEVITCH, E.: *"Can denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of amplified 16s rDNA of soil bacterial populations be used in forensic investigations?"*, en Soil Biology & Biochemistry 38, 2006, págs. 1188 y ss. Disponible en: www.elsevier.com/locate/soilbio.

¹³⁵ LERNER, A., SHOR, Y., VINOKUROV, A., OKON, Y., JURKEVITCH, E.: *"Can denaturing gradient ..."*, Op. cit, págs. 1188 y ss.

- b) La recogida de la muestra y el almacenamiento debe ser normalizado para reducir al mínimo el impacto sobre la comunidad de bacterias, y el análisis debe realizarse lo más rápidamente posible tras la toma de muestras¹³⁶.
- c) El estudio molecular de los suelos de las diferentes regiones geográficas y climáticas debe ser realizado mediante las directrices indicadas para obtener una gran cantidad de datos.

2.2.2.4. Admisibilidad en juicio de la prueba genético-microbiológica (Israel)

Aludiendo a los criterios establecidos en la sentencia Daubert, estos han sido parcialmente aceptados en el Derecho Israelí. Cabe destacar en este sentido que, en Israel, el foco principal se centra en la pregunta sobre el peso de la prueba, a diferencia de la cuestión de la admisibilidad. En este sentido, el Tribunal examina unas determinadas condiciones:

- El grado por el cual ha sido aceptado el método en la importante comunidad científica- por no decir que el método o la teoría deba ser totalmente aceptada.
- Tasa de error conocida o potencial.
- La medida en la cual se puede probar la teoría y pueda ser sometida a una estrecha supervisión por parte de peritos.

Aunque estas normas son aplicadas mayormente teniendo en cuenta el peso de la prueba y no su admisibilidad, en los casos donde se presente por primera vez ante el Tribunal una nueva teoría científica, el Tribunal también analiza el grado de validez del método o teoría científica. Una vez aceptada por primera vez la tesis científica por el Tribunal, el centro de atención en futuros casos y audiencias orales pertenece a las conclusiones de los peritos y a los específicos detalles relevantes de la prueba para cada uno de estos casos.

2.2.2.5. La prueba pericial microbiológica de suelos en Estados Unidos

El informe “Science Found Waiting in Nations Crime Labs”¹³⁷ redactado por la Academia Nacional de Ciencia de Estados Unidos, hace hincapié en la necesidad de que los laboratorios de criminología incorporen más ciencia en los servicios que ofrecen. La inmensa cantidad de información conocida sobre el genoma humano ha contribuido al desarrollo de un Protocolo de Análisis de ADN completo y ampliamente aceptado. Sin embargo, no todas las escenas del crimen contendrán pruebas de ADN humano. Por tanto, la comunidad forense ha reconocido que, cuando sea apropiado, deberían utilizarse otros tipos de ADN no humano. En este sentido, todas las plantas, animales, y materiales del suelo contienen diversa información genética, y pueden potencialmente ser incluidas como valiosas piezas de prueba en casos forenses¹³⁸.

Sin embargo, con el ADN humano actuando como un catalizador para la tecnología de la ciencia forense a finales de los años 1980, no es sorprendente que la mayoría de los laboratorios forenses nacionales sean principalmente destinados al análisis de ADN humano. También es verdad que, por razones financieras, es la prueba de ADN humano la que rutinariamente se presenta en los laboratorios para peritar. Aunque no es razonable esperar que la prueba de ADN no humano sobrepase algún día al ADN humano en términos de volumen, la potencial información que está dentro de estas muestras no es trivial, especialmente en casos donde la prueba de ADN humano no pueda ser usada o no esté disponible.

¹³⁶ WINTZINGERODE, F.V., GOBEL, U.B., STACKEBRANDT, E.: “Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis”, FEMS Microbiology Reviews 21, 1997, págs. 213 a 229.

¹³⁷ MOORE, S.: “Science Found Waiting at Nations Crime Labs”, The New York Times, 2009. Disponible en <http://www.nytimes.com>

¹³⁸ HALVERSON, J.L., BASTEN, C.: *Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects*, Croatian Medical Journal 46 (4), 2005, págs. 598 a 605. HORSWELL, J., CORINDER, S.J., MAAS, E.W., MARTIN, T.M.K., SUTHERLAND, K.B.W., SPEIR, T.W., NOGALES, B., OSBORN, A.M.: *Forensic comparison of soils ...*, Op. cit págs. 350 a 353. MENOTTI-RAYMOND, M.A., DAVID V.A., O'BRIEN, S.J.: “Pet cat hair implicates murder suspect”, Nature 186, 1997. Pág. 774. MILLER COYLE, H., LADD, C., PALBACH, T., LEE, H.C.: *The green revolution: Botanical Contributions to forensic and drug enforcement*, Croatian Medical Journal 42 (3), 2001, págs. 340 a 345. YOON, K.C.: *Botanical witness for prosecution*, Science 260 (5110), 1993, págs. 894 a 895.

Antes de referir aspectos referentes acerca de la prueba pericial microbiológica de suelos en Estados Unidos, es importante hacer alusión a una característica del suelo que es fundamental considerar desde el punto de vista del muestreo para la ejecución de la pericia genético-microbiológica:

El carácter y la composición de los suelos varían lateralmente, pero también lo hacen en función de la profundidad. A menos que el delito cometido, implique la excavación de una tumba, la mayoría de las comparaciones de muestras de suelo se toman de la superficie superior. Se deben tomar muestras suficientes que deberían ser presentadas a fin de establecer la distribución normal del suelo de un tipo particular en y sobre una escena del crimen. Generalmente, son suficientes dos o tres muestras de suelo de la escena del crimen¹³⁹.

en definitiva, el análisis de ADN de las poblaciones microbianas contenidas en las muestras de suelo puede llegar a ser muy relevante para la resolución de un caso.

Por eso, en Estados Unidos, según muestra un informe presentado por la Universidad de Connecticut¹⁴⁰, se acepta que la muestra de suelo pueda ser utilizada en las investigaciones forenses, donde las bacterias del suelo sean usadas para generar perfiles de ADN.

La prueba del suelo es muy diferente de las pruebas de plantas y animales en el sentido de que el perfil de ADN que se pueda obtener tanto de la planta como del animal se genera a partir del genoma de una especie. Incluso si hay una mezcla de múltiples pelos de animales u hojas, estas muestras pueden ser susceptibles de ser separadas. Estos casos no son como los casos con suelo, donde el camino más común actualmente para general perfiles de ADN cotejables es utilizar el microbioma¹⁴¹.

El suelo es probablemente uno de los ecosistemas microbianos más diversos del planeta. Su abundancia y diversidad hacen de las bacterias un excelente objetivo molecular para los análisis del suelo. Sin embargo, el temprano uso del suelo en las investigaciones forenses no incluyó ninguna tipificación de métodos moleculares.

2.2.2.6. La evolución de los métodos de análisis de suelo (EE.UU)

En 1935, el Despacho Federal de Investigación de Estados Unidos empezó a analizar muestras de suelo basándose en propiedades físicas¹⁴². La clasificación física del suelo basada en el color, composición mineral y textura puede proporcionar valiosos puntos de comparación debido a la amplia variación en cada una de esas clasificaciones.

Es importante destacar que dos muestras de suelo pueden tener la misma clasificación textural sin tener la misma población de bacterias¹⁴³. Esto no se conocía antes del uso de los métodos moleculares para el análisis de las bacterias del suelo.

Un estudio publicado en 1996 por SUGITA y MARUMO¹⁴⁴, sugirió que la clasificación por color podría ser utilizada para diferenciar, en el ámbito forense, las muestras de suelo. Sin embargo, según autores¹⁴⁵, cuando se combina con otras técnicas de clasificación, el poder de discriminación se incrementa.

Por otro lado, cuando se analizan las características físicas del suelo, se debe reconocer el potencial de una interpretación subjetiva. Determinando el color de una muestra de suelo basándose en una comparación

¹³⁹ DENNIS J.N.: "Soil samples for Forensic Analysis", Indianapolis – Marion County Forensic Services Agency, 2008. Disponible en: <http://www.indy.gov/egov/county/fsa/documents/soil.pdf>. En el mismo sentido, el artículo "Collection of Soil Samples", California. Disponible en: <http://www.crime-scene-investigator.net/CASoil.pdf>

¹⁴⁰ PIETRASZKIEWICZ BoU.: "Exploring Soil Bacterial Communities for Forensic Applications: A genomics Approach", Connecticut, 2010. <http://opencommons.uconn.edu/dissertations/AAI3464247>.

¹⁴¹ Denominamos microbioma al conjunto de genomas de la comunidad de los microorganismos que viven en un determinado ecosistema, como el suelo o nuestro organismo.

¹⁴² FINLEY, J.A.: *Geologic materials as physical evidence*, FBI Law Enforcement Bulletin 7 (3), 2004, págs. 2-7. En el mismo sentido, MORGAN, R.M., BULL, P.A.: *The philosophy, nature and practice of forensic sediment analysis*, Progress in Physical Geography 31 (1), 2007, págs. 43 a 58.

¹⁴³ Cfr. TATE, R.L.: *Soil Microbiology*, 2ª ed., New York, 2002.

¹⁴⁴ SUGITA, R., MARUMO, Y.: *Validity of colour examination for forensic soil identification*, Forensic Science International 83, 1996, págs. 201 a 210.

¹⁴⁵ Cfr. MILLER COYLE, H. (Edit.): *Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications*, Chapter 10: "Soil DNA Typing in Forensic Science", Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2008.

con una tabla de colores puede llevar a error, especialmente si el analista es principiante. Si debe hacerse una clasificación del suelo, sería prudente interpretar los datos por más de una persona. La situación ideal para un laboratorio de criminalística sería tener a mano uno o varios expertos en suelos. En definitiva, por estas razones y por otras más, el análisis forense de suelos ha evolucionado hacia un enfoque molecular. Admitiendo la tipificación de estas pruebas de ADN se hace uso de todos los científicos de ADN que ya forman parte del personal, especialmente si los métodos resultantes son similares a la tipificación del ADN humano.

2.2.2.7. Admisibilidad de las muestras de suelo y credibilidad científica (EE.UU)

Se ha indicado que el análisis de ADN de las poblaciones microbianas contenidas en las muestras de suelo, supone una novedad científica puesto que, hasta hace unos años, no había sido presentada ante los Tribunales en la mayoría de los países. La resolución en el caso Daubert¹⁴⁶ hace de guía sobre este tema. De acuerdo con dicha sentencia, la declaración de un perito debería ser confiable y relevante para el caso que nos ocupa. Como ya se mencionó, en el mencionado fallo se establecen cinco criterios para ayudar al juez a decidir si la prueba científica es confiable y válida:

- La teoría incluye un método científico y por tanto, éste debe ser ratificable, refutable y verificable.
- La teoría o técnica ha sido objeto de revisión y publicación científica.
- La conocida o potencial tasa de error del método debe ser considerada por el Tribunal.
- Existen criterios o controles del método.
- La teoría o técnica es generalmente aceptada en la importante comunidad científica.

Una de las consecuencias de la sentencia dictada en este caso en Estados Unidos es que el juez actúa como un portero que determina si la nueva tesis científica es aceptable y admisible en el Tribunal.

2.2.3. Casos penales en España. La prueba pericial microbiológica

En España, hasta la fecha, se conocen dos sentencias correspondientes a sendos casos en los que se utilizó la pericial genético microbiológica en su resolución.

2.2.3.1. STS 300/2013 (Sala 2ª) de 31 de Enero (Secuestro y asesinato)¹⁴⁷

En el hecho probado, tras describir el secuestro de la víctima en el que participa el acusado junto a otro u otros individuos no identificados, se afirma que “habiendo decidido estos individuos que debían acabar con la vida de Amalia para asegurar la impunidad de su acción, uno o varios de ellos aplicaron con sus manos una fuerte presión sobre el cuello de la víctima a fin de estrangularla, quedando Amalia en estado de inconsciencia pero aún con vida...”. En esa situación la trasladan en un vehículo y la arrojan al canal de Jabarrella, añadiendo el relato fáctico de la sentencia que “la víctima, que seguía inconsciente pero que aún vivía en el momento en que fue arrojada al canal, falleció minutos después por sumersión”.

*“...Tal como se razona en la resolución cuestionada, en los fundamentos de derecho primero y segundo, la versión del impugnante no es verosímil acerca de que no participó en los hechos que se le imputan. Son varios los indicios, sólidos y convergentes, que conducen a proclamar la autoría del recurrente, más allá de cualquier duda razonable: ...un testigo sitúa al acusado en el momento en que supuestamente se produce el secuestro, bloqueando la puerta del garaje de la víctima para evitar que se cerrara, sin motivo aparente, tal y como relató al Tribunal en el juicio; **las periciales demostraron indubitadamente** que la cinta y las cuerdas utilizadas para amordazar y maniatar a la víctima, eran idénticas a las halladas en el garaje del procesado, y **que la arena con la que se rellenaron los dos sacos que se ataron a la víctima para arrojarla al canal, coincidía exactamente con la del huerto del recurrente**¹⁴⁸.”*

¹⁴⁶ Como ya se ha indicado...Daubert v. Merrell Daw Pharmaceuticals Inc., 509, U.S 579, 1993.

¹⁴⁷ Disponible en <http://supremo.vlex.es/vid/-426765858>

¹⁴⁸ Se efectuaron los cotejos geoquímico y **genético-microbiológico** entre la arena obtenida de los sacos y la del huerto del investigado, arrojando resultados concluyentes.

2.2.3.2. SAP de Castellón 104/2010, de 23 de marzo (Robo con violencia y homicidio)

Señala los siguientes **hechos probados**: “El acusado, Aureliano, con el propósito de proceder al apoderamiento ilícito de cuanto pudiera encontrar en el domicilio de Marcial, sobre las 23:26 horas del 22 de junio de 2007 telefoneó a éste desde el locutorio existente en Cuevas de Vinromá, ofreciéndole mantener relaciones sexuales con la finalidad de convencerlo para que acudiera al terreno agrícola situado entre las calles Zaragoza y Travesa, de modo que una vez allí pudiera sustraerle las llaves de su domicilio, y así poder acceder con facilidad a su interior y apoderarse de aquello de valor que hallare y le pudiera interesar.

Ya en la parcela mencionada, el acusado se acercó a Marcial y tras reiterarle tal ofrecimiento aprovechó el momento en que éste procedía a bajarse los pantalones para agarrarle fuertemente por detrás, tratando primero de atarle las manos con una cinta adhesiva que portaba al efecto, sin conseguirlo debido al forcejeo que se produjo, para cogerle seguidamente por el cuello, con el brazo, y pese a ser consciente de la posibilidad de causarle la muerte por la fuerza que ejercía el acusado sobre el cuello de Marcial, continuó sujetándolo fuertemente con su brazo el suficiente tiempo, hasta que le causó la muerte por estrangulación. A continuación, con el juego de llaves se dirigió a la citada vivienda y tras acceder a la misma se apoderó de una cantidad indeterminada de monedas y billetes de las antiguas pesetas. ... Marcial tenía a la fecha de su muerte 63 años de edad y era soltero, siendo sus familiares más directos sus primos Nazario, Sixto, Elena, Juan Carlos, Luz y Everardo, este último ya fallecido con posterioridad a esa fecha. No ha quedado acreditado que el también acusado Feliciano haya participado en estos hechos.”

Tras la prueba practicada durante el juicio oral, el fallo de la condena se sustenta fundamentalmente en dos **pruebas periciales**¹⁴⁹:

En primer lugar, en la **prueba pericial de ADN (genética humana)**. Dicha prueba compara el perfil genético obtenido de la saliva del acusado con el perfil genético derivado de la colilla de cigarrillo abandonada por el mismo en la escena del crimen y también obtenido de la cinta adhesiva enrollada y adherida a la camisa perteneciente a la víctima. Del resultado del análisis se desprende que ambos perfiles genéticos coinciden plenamente. En segundo lugar, en la **prueba pericial genético-microbiológica derivada del análisis de las muestras de tierra** tomadas del lugar de los hechos y de las zapatillas del acusado.

Estos análisis, elaborados por los agentes de la Guardia Civil, del Laboratorio de Medio Ambiente, permiten llegar a la conclusión de que, una vez aislada e identificada la especie bacteriana a partir de la muestra de suelo proveniente de la zona del cadáver y tras proceder al análisis comparativo con la secuencia genética obtenida de los restos de tierra adheridos a las zapatillas del acusado, “se aísla y detecta la misma especie de bacteria¹⁵⁰”.

¹⁴⁹ Llama la atención, en sentido positivo, el que ambas periciales llegan básicamente a la misma conclusión de forma independiente, teniendo en cuenta que la pericial genético-microbiológica estaba en fase inicial de implantación.

¹⁵⁰ Posteriormente se confirmó la cepa mediante comparativa base a base de las secuencias.

CONCLUSIONES

- El uso del ADN bacteriano del suelo con finalidades forenses no es un procedimiento todavía rutinario en España, pero es utilizado en otros países (Holanda, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Italia e Israel).
- Las medidas de distancia ecológica (Bray Curtis) u otros coeficientes de correlación pueden ser utilizados para expresar la similitud entre muestras de suelo, comparando ADN bacteriano procedente de las mismas, ya que una coincidencia exacta nunca se logrará debido a la variación biológica y técnica y a los efectos de muestreo.
- El protocolo IT-M-212 (secuenciación de 500 pb del rDNA16S) ha sido validado y acreditado conforme a la norma ISO 17025, requisito fundamental para su estandarización y empleo como herramienta forense.
- Los trabajos realizados en el ámbito del proyecto internacional MiSAFE han contribuido a la estandarización internacional del empleo de los T-RFLP obtenidos de ADN bacteriano para la comparativa de muestras de suelo.
- La técnica de T-RFLP asegura el descarte de muestras no relacionadas, además de comparar las relacionadas, mientras que la técnica de secuenciación de 500 pb del rDNA16S puede permitir en la comparativa una aproximación fina entre muestras de suelo objeto de cotejo.
- Se obtiene un índice global de eficiencia (SR) del **80-85%** en el cotejo estadístico de ADN bacteriano procedente de muestras de suelos, por lo que se puede confirmar que la pericial microbiológica es una herramienta óptima para uso criminalístico.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ BUJÁN, M.V.. *Reflexiones críticas en torno a la prueba en el proceso penal español: especial referencia a la prueba preconstituida y a la prueba anticipada*. Boletín Ministerio Justicia nº 2180, 2015.
- ATLAS y BARTHA. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*, 4ª edición. Addison, Madrid (2002).
- BÄR W, BRINKMANN B, BUDOWLE B, CARRACEDO A, GILL P, HOLLAND M, LINCOLN P, MAYR W, MORLING N, OLAISEN B, SCHNEIDER P, TULLY G, WILSON M. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int. J. legal Med.* 113 (2000): 193-196 and *Forensic Sci. Int.* 110 (2000).
- BARCLAY, A. D., DAWSON, L. A., DONNELLY, L. J., MILLER, D. R., RITZ, K.: *Criminal and Environmental Soil Forensics*, London, 2009.
- BOURGUIGNON, L.; CORDERO PÉREZ, J.C.; DESMYTER, S.; EGYED, B.; HELLMANN, A.P.; KUIPER, I.; PADAR, Z.; SANTILLANA, E.J.; STAGINNUS, C. “*Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for Forensic Examination of Non Human Biological Traces*”. ENFSI-BPM-APS-01. Versión 1. Noviembre 2015. Publicado 08/06/2016. <http://www.enfsi.eu/documents/best-practice-manuals>.
- BULL, P.A, PARKER, A., MORGAN, R.M.: *El análisis de tierra y sedimentos de un molde de huella de zapatos*, *Forensic Science International*. 2006 Oct. 16; 162 (1-3).
- CARRASCO ANDRINO, M^a. *La falsedad en el dictamen pericial o en la traducción del intérprete en causa judicial*. Cuadernos de política criminal. Número 110, II, Época II, septiembre 2013.
- CHISUM, W., TURVEY, B.: *Evidence dynamics: Locard's Exchange principle and crime reconstruction*, *Journal of Behavioral Profiling* .Vol.1, núm. 1. Enero 2000.
- CLAROS DÍAZ, M. G. “Marcadores moleculares...” (Universidad de Málaga) disponible en <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>
- CORDERO PÉREZ, J.C.: “Análisis criminalístico de suelos (I). La aportación de la microbiología a la prueba pericial”, en IBÁÑEZ PEINADO, J. (Coord.): *Técnicas de Investigación Criminal*, 2ª ed., Madrid, 2012.
- CUMMINGS CRAIG, A., RELMAN David A. *Microbial forensics - “cross-examining pathogens”*. *Science*, vol. 296, June 2002.
- DÁVILA VILLEGAS, M.J.: “*Procedimientos de análisis de suelos en una investigación criminal. Segunda Parte: Análisis y Experimentos*”, disponible en: [http://www.tec.url.edu.gt/boletin/ URL_15_QUI02.pdf](http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_15_QUI02.pdf)
- DAWNAY N., OGDEN R., THORPE R., POPE L., DAWSON D., MCEWING R. “*A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: a framework for developing profiling systems for wildlife species*”. *FSI Genetics* 2, 2008.
- DAWSON, L., HILLIER, S.: “*Measurement of soil characteristics for forensic applications*”, Wiley Inter-science, 2010. Disponible en: <https://people.ok.ubc.ca/orcac/soil%20characteristics.pdf>
- DE LUCA, S., NAVARRO, F. y CAMERIERE, R.. La prueba pericial y su valoración en el ámbito judicial español. *Revista Electrónica de Ciencia Penal y Criminología* (en línea). 2013, núm. 15-19, p. 19:1-19:14. Disponible en internet: <http://criminet.ugr.es/recpc/15/recpc15-19.pdf> [RECPC 15-19 (2013), 26 dic]
- DENNIS J., N.: “*Soil samples for Forensic Analysis*”, Indianapolis/ Marion County Forensic Services Agency, 2008. Disponible en Internet: <http://www.indy.gov/egov/county/fsa/documents/soil.pdf>
- DOLZ LAGO, M. J. (Dir.), FIGUEROA NAVARRO, C. (Coord.) *La prueba pericial científica*. Colección de Ciencias Jurídicas y Forenses. Edisofer, Madrid, 2012.

- FIERER N.; LAUBER, C.; ZHOU, N.; MCDONALD, D.; COSTELLO, E; KNIGHT, R. “*Forensic identification using skin bacterial communities*” en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, n. 14, April 6, 2010. Disponible en www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107.
- FIGUEROA NAVARRO, C.: “*Análisis Jurisprudencial sobre el valor probatorio de los informes periciales emitidos por los organismos oficiales: en especial la prueba científico-policial*” en DOLZ LAGO, M.J. (Dir.) y FIGUEROA NAVARRO, C. (Coord.): *La prueba pericial científica*, Edisofer, Madrid, 2012.
- FIGUEROA NAVARRO, C.: “El aseguramiento de las pruebas y la cadena de custodia”, *La Ley Penal*, nº84, julio 2011.
- FIGUEROA NAVARRO, C. (Dir.): *La cadena de custodia en el Proceso Penal*. Edisofer, Madrid, 2015.
- FINLEY, J.A.: *Geologic materials as physical evidence*, FBI Law Enforcement Bulletin 7 (3), 2004.
- FITZPATRICK, R.W.: *Soil: Forensic Analysis*, en Wiley Encyclopedia of Forensic Science, United Kingdom, 2009.
- FITZPATRICK, R.W., RAVEN, M.D., FORRESTER, S.T.: “*A systematic approach to soil forensics: Criminal case studies involving transference from crime scene to forensic evidence*”, en RITZ, K., DAWSON, L., MILLER, D.: *Criminal and environmental soil forensics*, The Netherlands, 2009.
- FITZPATRICK, R.W., RAVEN, M.D.: “*How pedology and mineralogy helped solve a double murder case: Using forensics to inspire future generations of soil scientists*,” 2012. Disponible en: <https://www.soils.org/publications/sh/articles/53/5/14>
- GARCÍA RUIZ, F. Capítulo “La prueba pericial” en *Técnicas de Investigación Criminal* (Ibáñez Peinado, J.) 2ª edición, Dykinson, Madrid, 2012.
- GASCÓN ABELLÁN, M. “*Validez y valor de las pruebas científicas: la prueba del ADN*”. Cuadernos Electrónicos de Filosofía del Derecho, 15 (2007), I.S.S.N.: 1138-9877.
- GIAMPAOLI S., BERTI A., DI MAGGIO R.M., PILLI E., VALENTINI A., VALERIANI F., GIANFRANCESCO G., BARNI F., RIPANI L., ROMANO SPICA V.: “*The environmental biological signature; NGS profiling for forensic comparison of soils*”. *Forensic Science International* 240 (2014).
- GIL VALLEJO, B.: “*Naturaleza de la prueba pericial y la actuación del perito en el acto de juicio*” *Diario La Ley*, Nº 7818, 14 de Marzo de 2012.
- GILL P., SPARKES R., KIMPTON C.: “*Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system*”. *Forensic Science International* 89 (3), 1997.
- GIMENO SENDRA, V. “*Manual Derecho procesal penal*.” Ediciones Jurídicas Castillo de Luna, Madrid, 2015.
- GÓMEZ COLOMER, J.L. “*Introducción al proceso penal español*”. Nuevo Foro Penal, 1985, https://www.unifr.ch/ddp1/derechopenal/articulos/a_20080521_89.pdf
- GÓMEZ DE LIAÑO GONZÁLEZ, F. “*El proceso penal tratamiento jurisprudencial*.” 7ª Edición. Ed. Forum, Oviedo, 2004
- HOPKINS, D.W., WILTSHIRE, P.E.J., TURNER, B.D.: “*Microbial characteristics of soils from graves: an investigation at the interface of soil microbiology and forensic science*”, en *Applied Soil Ecology* 14(3), 2000.
- HORSWELL, J. et al.: “*Forensic Comparison of Soils by Bacterial Community DNA Profiling*” en *Journal of Forensic Sciences*, 2002, nº 47.

- JOHNSTON, R.M., BARRY, S.J. , BLEYS,E., BUI, E.N., MORAN, C.J., SIMON, D.A.P., CARLILE, P., MCKENZIE, N.J., HENDERSON, B.L., CHAPMAN, G., IMHOFF, M., MASCHMEDT, D., HOWE, D., GROSE, C., SCHOKNECHT, N.: “*ASRIS: The data base*”, Australia, 2003.
- KONEMAN, E. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Panamericana, 6ª ed., Buenos aires, 2008.
- LADRÓN TABUENCA, P. “*La cadena de custodia en el proceso penal español: revisión normativa*”; en La cadena de custodia en el proceso penal (Dir. Carmen Figueroa). Edisofer, Madrid, 2015.
- LEAL MEDINA, J.: “*El tratamiento procesal y penal del ADN. Aspectos biológicos y jurídicos que definen su aplicación y las consecuencias que produce en el campo de la prueba*”, en Diario la Ley, nº 8190. Noviembre 2013.
- LERNER, A., SHOR, Y., VINOKUROV, A., OKON,Y., JURKEVITCH,E.: “*Can denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of amplified 16s rDNA of soil bacterial populations be used in forensic investigations?*”, en Soil Biology & Biochemistry 38, 2006. Disponible en: www.elsevier.com/locate/soilbio
- LINACRE A., GUSMAO L., HECHT W., HELLMANN A.P., MAYR W., PARSON W., PRINZ M., SCHNEIDER P., MORLING N. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. FSI Genetics 5, 2011.
- LOCARD, E. “*La police et les méthodes scientifiques*”. Editions Rieder, París, 1934
- LOMBARDI, G. J.: “*The Contribution of Forensic geology and Other Trace Evidence Analysis to the Investigation of the Killing of Italian Prime Minister Aldo Moro*”. Forensic Science International, nº 44, 1999.
- LUCENA MOLINA, J.J.; ESCOLA, M.A. y PARDO IRANZO, V. “*Elementos para el debate sobre la valoración de la prueba científica en España: hacia un estándar acreditable bajo la norma ISO 17.025 sobre conclusiones de informes periciales.*” Revista Internacional de Estudios de Derecho Procesal y Arbitraje (RIEDPA) nº2. Septiembre2011. http://www.academia.edu/1184026/JOS%C3%89_JUAN_LUCENA_MOLINA_MIGUEL_%C3%81NGEL_ESCOLA_GARC%C3%8DA_Y_VIRGINIA_PARDO_IRANZO_Elementos_para_el_debate_sobre_la_valoraci%C3%B3n_de_la_prueba_cient%C3%ADfica_en_Espa%C3%B1a_hacia_un_est%C3%A1ndar_acreditable_bajo_la_norma_ISO_17.025_sobre_conclusiones_de_informes_periciales_
- MACDONALD,C. A., ANG, R., ENG. B., CORDINER, S.J., HORSWELL, J. “*Discrimination of Soils at Regional and Local Levels Using Bacterial and Fungal T-RFLP Profiling*”. J .Forensic Science, Enero 2011, Vol. 56, No. 1 doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01542.x. Disponible online en: interscience.wiley.
- MEGA 6©. Manual del programa de filogenia (<http://www.megasoftware.net/docs>).
- MILLER COYLE, H. (Edit.): *Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications, Chapter 10: “Soil DNA Typing in Forensic Science”*, Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2008.
- MONTERO AROCA, J., GÓMEZ COLOMER, J.L., MONTÓN REDONDO, A., BARONA VILAR, S.: “*De-recho Jurisdiccional III. Proceso Penal*”, 12ª ed. Tirant lo Blanch, Valencia, 2004.
- MOORE, S.: “*Science Found Waiting at Nations Crime Labs*”, The New York Times, 2009. Disponible en <http://www.nytimes.com>
- MORGAN, R.M., BULL, P.A.: “*The philosophy, nature and practice of forensic sediment analysis*”, Progress in Physical Geography 31 (1), 2007.
- MURRAY, R.C.: “*Evidence from the Earth: Forensic Geology and Criminal Investigation*”, Mountain Press: Missoula, MT, 2004.
- OLSEN GJ, WOESE CR. “*Ribosomal RNA: a key to phylogeny*”. FASEB Journal 1993; Enero, 7. Págs. 113-123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422957>

- PASTERNAK, Z., ASHRAF, A., GATICA, J., GAFNY, R., AVRAHAM, S., FRENK, S., MINZ, D., GILLOR, O., JURKEVITCH, E.: “*Optimization of molecular methods and statistical procedures for forensic fingerprinting of microbial soil communities*”, International Research Journal of Microbiology, Vol.3 (11), Noviembre 2012. Disponible en: <http://www.interesjournals.org/IRJM>
- PIETRASZKIEWICZ BoU.: “*Exploring Soil Bacterial Communities for Forensic Applications: A genomics Approach*”, Connecticut, 2010. Doctoral dissertations <http://opencommons.uconn.edu/dissertations/AI3464247>
- POPTOOLS (<http://www.cse.csiro.au/poptools>),
- QUAAK, F.C.A., KUIPER, I. “*Statistical data analysis of bacterial T-RFLP profiles in forensic soil comparisons.*” Forensic Science International 210, 2011.
- ROBERTS,T.L.; HENRY, J.L. “*El muestreo de suelos: los beneficios de un buen trabajo*”.En [http://www.ipni.net/publication/ialahp.nsf/0/97F3E059E43811A0852579A300790776/\\$FILE/EI%20muestreo%20de%20suelos.pdf](http://www.ipni.net/publication/ialahp.nsf/0/97F3E059E43811A0852579A300790776/$FILE/EI%20muestreo%20de%20suelos.pdf)
- RODICIO M., MENDOZA, M.C. “*Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*”. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.Vol. 22 , núm. 4. Elsevier, 2004.
- RODRIGO DE LARRUCEA, C. “*La contradicción en el dictamen pericial: tratamiento conceptual de «la sana crítica» y efectos prácticos*”. Diario La Ley, N° 7494, Sección Práctica Forense, 22 de Octubre de 2010, Año XXXI, Editorial LA LEY.
- RODRIGUEZ JIMENEZ, E. “*La cadena de custodia en los laboratorios oficiales de criminalística y ciencias forenses de España*”. Cap.2 en La cadena de custodia en el proceso penal (Dir. FIGUEROA NAVARRO) Edisofer, Madrid, 2015.
- SANTILLANA REYES, E.J.: “*Análisis criminalístico de suelos*”, en IBÁÑEZ PEINADO, J. (Coord.): Técnicas de Investigación Criminal, Dickinson, 2ª Ed., Madrid, 2012.
- SANTILLANA REYES, E.J.; CORDERO PÉREZ, J.; ALAMILLA, F: “*Forensic Soil Analysis: Case Study of looting at a Roman-Visigothic Burial Vault*”. Capítulo 4 en Soil in Criminal and Environmental Forensics (Proceedings of the Soil Forensics Special, 6th European Academy of Forensic Science Conference, The Hague). Kars- van den Eijkel (The Netherlands) Springer International Publishing, Switzerland, 2016.
- SEISnet “Sistema español de información de suelos sobre internet” presenta datos transferidos por el CSIC <http://evenor-tech.com/banco/seisnet/seisnet.htm>
- SIBONY, R.; SERRANO OCHOA, M^a. A. y REINA, O. “*La prueba y el derecho a la dispensa del deber de declarar por la testigo-víctima en los procedimientos de violencia de género*” <http://noticias.juridicas.com/conocimiento/articulos-doctrinales/465201/04/2011>.
- SORIANO SOTO, M.A. DESAMPARADOS; SANCHO CIVERA, J.; VERDÚ BELMONTE, A. “*Práctica de Diagnóstico y Fertilidad de Suelos*”. Universidad Politécnica Valencia, Valencia, 2004.
- SOROKIN A. “*Multiple-locus sequence typing analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains*”. Applied and Environmental Microbiology, vol.72, n° 29. Febrero 2006.
- SUGITA, R., MARUMO, Y.: “*Principles, Techniques and Applications*”, Forensic Geoscience, Londres, 2004.
- SUGITA, R., MARUMO, Y.: “*Validity of colour examination for forensic soil identification*”. Forensic Science International 83, 1996.
- TATE, R.L.: “*Soil Microbiology*”, 2ª ed., New York, 2002

- TARUFFO, M. “*La Prueba*”. Traducción de Laura Manríquez y Jordi Ferrer Beltrán, Marcial Pons, Madrid, 2008.
- TOMÁS Y VALIENTE, F. “*In dubio pro reo*”, libre apreciación de la prueba y presunción de inocencia. Revista Española de Derecho Constitucional. Año 7. Núm. 20. Mayo-Agosto 1987
- TORSVIK, V., ØVREÅS, L. y THINGSTAD, T.F. “*Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors*”. Science, nº 296, 2002.
- UITDEHAAG, S; QUAACK, F.; KUIPER, I.: “*Soil Comparisons Using Small Soil Traces, A Case Report* “. Capítulo 5 en Soil in Criminal and Environmental Forensics (Proceedings of the Soil Forensics Special, 6th European Academy of Forensic Science Conference, The Hague). Kars- van den Eijkel (The Netherlands), Springer International Publishing, Switzerland, 2016.
- VEGAS TORRES, J. “*Análisis sobre la prueba pericial en la Ley de Enjuiciamiento Civil y en el proceso penal español*”. En P. Laguna y otros, La prueba pericial económica en el ámbito procesal español, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, 2009.
- WINTZINGERODE, F.V., GOBEL, U.B., STACKEBRANDT, E.: “*Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis*”, FEMS Microbiology Reviews 21, 1997.
- WOESE, C.R., STACKEBRANDT, E., MACKIE, T.J., FOX, G.E. “*A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa*”. Systematic and Applied Microbiology, 1985;vol.6.

ANEXOS

ANEXO A

Resultados Test Intercomparativo: correlación entre morfotipos de las muestras “Control soil samples” S1, S2, S3, SA y SB.

1.1.1 Estudios genéticos de los morfotipos bacterianos en muestras de suelos.

Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo **IT-M-212**.

- **Muestras de suelo para ser estudiadas.**

Las muestras fueron aportadas por ENFSI-APST-WG (Grupo de trabajo ENFSI)

MUESTRAS					RECEPCIÓN LAB.
Soil sample A	Soil sample B	Soil control 1	Soil control 2	Soil control 3	10 de diciembre 2014

- **Cultivo bacteriano de las muestras de tierra.**

-Se utilizaron 200 mg de cada muestra de tierra (SA, SB, S1, S2, and S3), que sirvieron como inóculos para tubos que contenían 10 ml de medio tamponado de peptona-glucosa.

-Muestras se incubaron durante 24 h at 37 °C.

-Después de la incubación, se inocularon placas de agar sangre con 2 µl de muestra de cultivo e incubadas 24 h a 37 °C.



- **Morfotipos de colonias de bacterias aisladas de muestras de tierras.**

Los diferentes morfotipos que se observan en cada muestra, se recogen en las siguientes tablas y figuras:

Tabla 1. Características de los morfotipos aislados en la muestra de tierra “Suelo control S3”.

Morfotipos “Suelo control S3”		
S3.1	S3.2	S3.3
Circular	Circular	Circular
Plana	Elevada	Elevada
Borde liso	Liso	Liso
Tamaño unos 3mm	2-3 mm	Unos 3 mm
Grisácea/Borde blanco	Blancas, centro más blanco	Blancas
Brillantes	Brillantes	Más brillantes
Opacas	Opacas	Opacas
Viscosas	Viscosa	Viscosa, untuosa

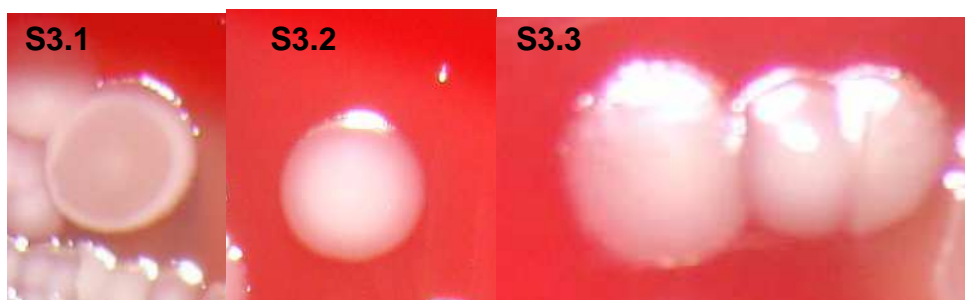


Figura 1. Fotografías de los morfotipos aislados de la muestra de suelo “Suelo control S3”.

Tabla 2. Características de los morfotipos aislados en la muestra de suelo “Suelo control S1”.

Morfotipos “Suelo control S1”				
S.1.1	S1.2	S1.3	S1.4	S1.5
Irregular	Irregular	Puntiforme	Irregular/circular	Irregular/ circular
Plana	Elevada	Elevada centro	Elevada/pulviniforme	Plana
Borde continuo/ lobulado	Borde discontinuo, ondulado, irregular	Ondulado/ Irregular	Encrespado/ondulado	Encrespado
2.5 mm	4 mm	2 mm	5-7 mm	3-4 mm
Blanco-gris	Blanco	Blanco/verdoso/a marillo	Grisáceo (centro más oscuro, borde más claro)	Blanco/ grisáceo (centro punto blanco)
Mate	Brillo	Mate	Mate	Brillo
Translúcida	Translúcida	Opaca	Opaca	Translúcida, centro opaco
Viscosa	Viscosa	Mantecosa	Viscosa/membranosa	Viscosa

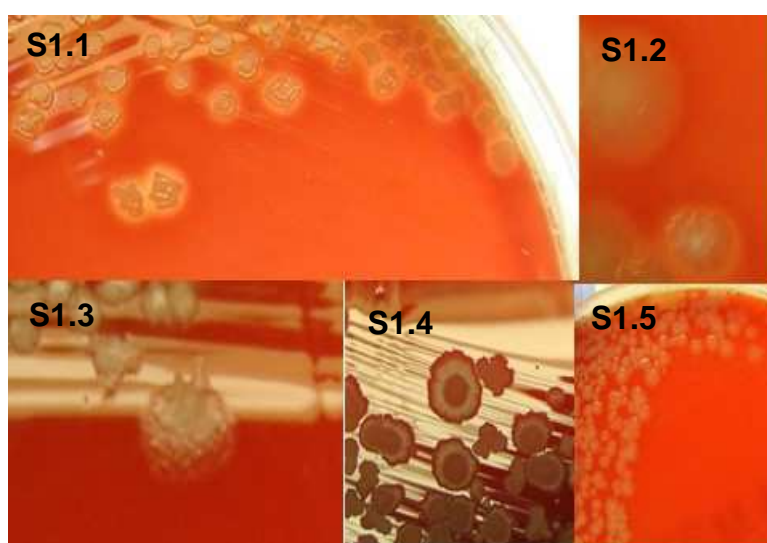


Figura 1. Fotografías de los morfotipos aislados de la muestra de suelo “Suelo control S1”.

Tabla 3. Características de los morfotipos aislados en la muestra “Suelo control S2”.

Morfotipos “Suelo control S2”	
S2.1	S2.2
Irregular/circular	Circular
Plana, centro algo abultado	Botón
Borde liso	Borde liso
7-8 mm	< 2 mm
Verde/grisáceo	Blanco amarillo verdoso
Mate	Brillo
Opaca	Opaca
Untuosa	Untuosa

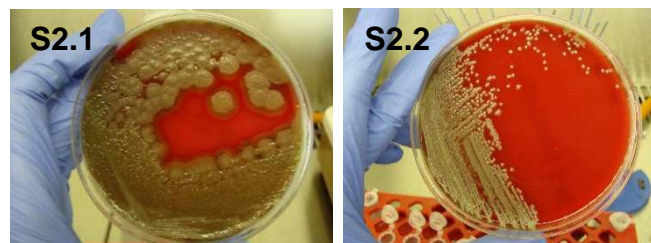


Figura 3. Fotografías de los morfotipos aislados de la muestra de suelo “Suelo control S2”.

Tabla 4. Características de los morfotipos aislados en la muestra “Suelo control SA”.

Morfotipos “Suelo control SA”					
SA.1	SA.2	SA.3	SA.4	SA.6	SA.7
Circular	Circular	Circular/irregular	Irregular	Irregular	Circular/Irregular
Elevada (forma botón)	Plana	Elevada (centro)	Elevada (pompas)	Plana, centro elevado	Plana
Liso	Liso	Irregular	Encrespado	Borde encrespado	Encrespado
Tamaño < 2mm	3 mm	5-7 mm	2-3 mm	3-5 mm	> 5 mm
Blanca	Blanca	Oscura. Centro gris y borde mas claro	Blanca	Blanco-verdoso (centro más color)	Gris
Brillante	Brillante-mate	Mate	Brillante	Brillante leve	Brillante
Opaca	Translúcida	Opaca	Opaca	Translúcida	Opaca
“Untuosa”	Mantecosa	Viscosa/membranosa	Untuosa	Untuosa	Untuosa

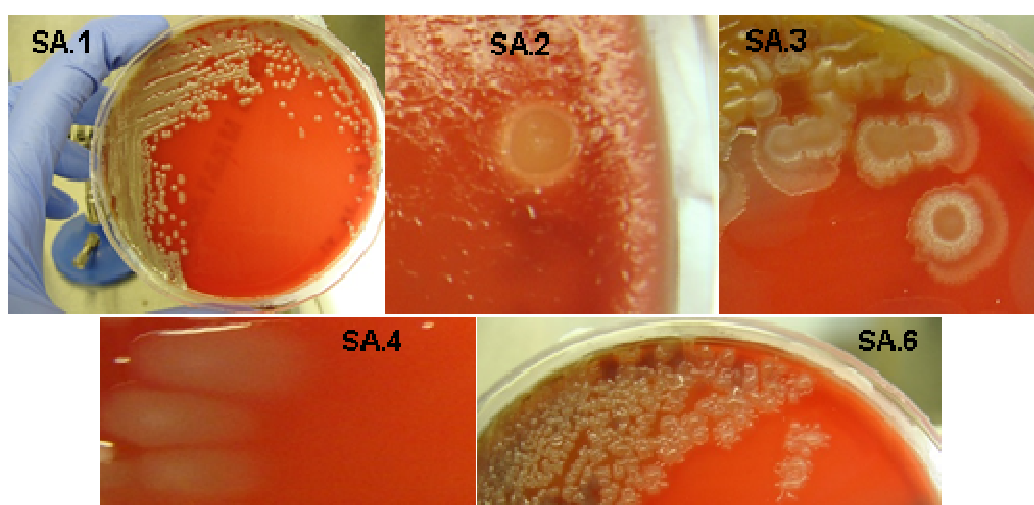
**Figura 4.** Fotografías de los morfotipos aislados de la muestra de suelo “Suelo control SA”.

Tabla 5. Características de los morfotipos aislados de la muestra “Suelo control SB”.

Morfotipos “Suelo control SB”			
SB.1	SB.2	SB.3	SB.4
Irregular	Circular/irregular	Irregular	Circular
Flat (centro algo elevado)	Elevada	Plana	Elevada Botón
Encrespado/festoneado	Borde ondulado	Lobulado/festoneado	Irregular/festoneado
Ø 5-6 mm	Ø 5-8 mm	Ø 3 mm	Ø 2 mm
Blanquecina	Gris (centro gris oscuro, borde más claro)	Blanco/verdoso	Gris
Mate (algo brillo)	Mate	Mate	Brillante
Opaca	Opacas	Translúcida	Opacas
Viscosas	Viscosa	Untuosa	Viscosa, untuosa

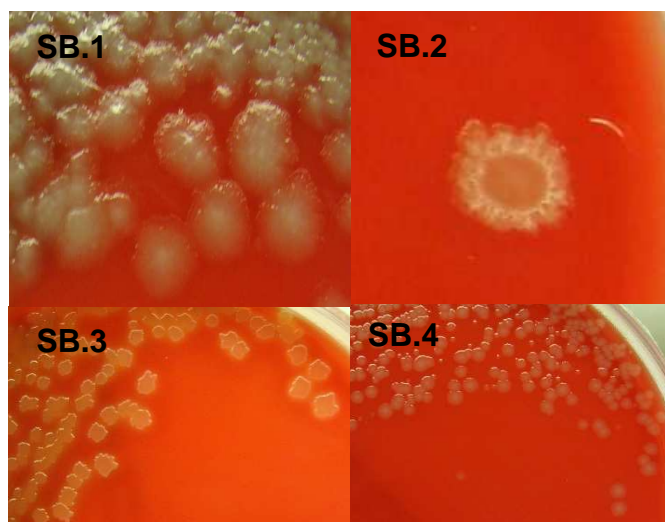


Figura 5. Fotografía de los morfotipos aislados de la muestra “Suelo control SB.”

- **Extracción ADN bacteriano, limpieza y concentración.**

El ADN de cada morfotipo fue extraído, limpiado y concentrado de acuerdo con el protocolo establecido (Tabla 6).

Tabla 6. Pureza y concentración de ADN extraído de muestras de tierras S1, S2, S3, SA,

Morfotipo	Pureza 260/280*	Concentración (ng/μL)
c. negativo **	2,206	4,533
c. positivo ***	1,986	20,673
SA.1.1	2,118	9,726
SA.1.2	2,03	13,039
SA.1.3	2,203	8,299
SA.2.1	2,135	4,85
SA.3.1	1,885	6,153
SA.4.1	1,72	13,302
SA.5.1	1,967	15,363
SA.5.2	1,986	20,695
SA.6.1	1,949	27,353
SA.6.2	1,862	17,159
SA.7.1	2,031	34,423
SA.7.2	2,035	17,661
SB.1.1	1,795	20,33
SB.1.2	1,981	26,907
SB.1.3	1,953	25,14
SB.2.1	1,685	13,414
SB.2.2	2,074	5,303
SB.2.3	1,962	13,402
SB.3.1	2,152	7,465
SB.3.2	1,916	13,557
SB.3.3	1,967	8,869
SB.4.1	2,019	8,178
SB.4.2	1,965	14,669
SB.4.3	2,01	14,982
S1.1.1	2,016	10,107
S1.1.2	1,941	8,526
S1.1.3	1,79	7,012
S1.2.1	1,872	5,414
S1.2.2	1,876	10,709

S1.3.1	1,943	4,993
S1.3.2	1,872	5,452
S1.3.3	2,098	11,357
S1.4.1	1,976	12,242
S1.4.2	1,936	7,869
S1.5.1	1,977	12,719
S1.5.2	1,996	15,932
S1.5.3	1,96	12,935
S2.1.1	1,953	44,247
S2.1.2	1,926	30,479
S2.1.3	1,92	69,52
S2.2.1	1,987	5,637
S2.2.2	2,054	11,799
S2.2.3	2,132	6,832
S3.1.1	2,266	7,353
S3.1.2	1,617	11,08
S3.1.3	2,063	6,268
S3.2.1	1,968	16,193
S3.2.2	2,03	12,856
S3.2.3	2,029	13,285
S3.3.1	2,007	23,816
S3.3.2	2,06	14,531
S3.3.3	1,996	19,977

*La relación de absorbancia a 260 y 280 nm se utiliza como dato de pureza de ADN y ARN. Una relación de ~1.8 indica que el ADN está puro; una relación de ~2.0 indica que el ARN está puro. Si la relación es inferior en ambos casos, indica la presencia de contaminación por proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a aproximadamente 280 nm (<http://www.nanodrop.com>).

** Solo reactivos de “extracción” y “limpieza y concentración”.

*** Nosotros añadimos como control, ADN de *Bacillus subtilis* a la columna de extracción y limpieza.

• ***Secuenciación parcial del 16S rDNA de los morfotipos.***

Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo establecido. Se incluyeron dos controles (positivos y negativos), uno durante la extracción y procedente del kit de PCR.

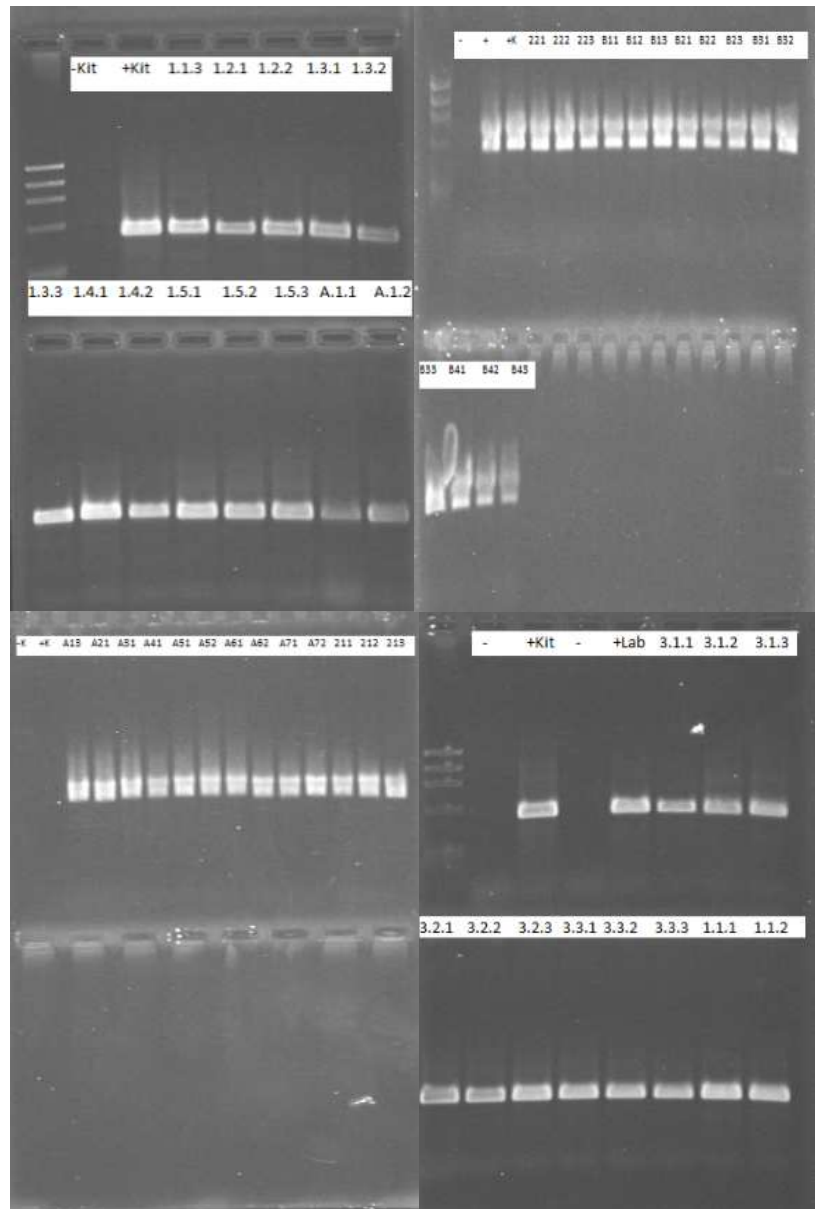
Geles de electroforesis de las PCR

Electroforesis de los ADNs amplificados por PCR (16S rDNA) de los diferentes morfotipos aislados de muestras control de tierras (Figura 6).

Figura 6. Electroforesis de los ADNr 16S amplificados a partir del ADN aislado de los diferentes morfotipos.

111 (Soil control S1, morphotype 1, strain 1)
 221 (Soil control 2, morphotype 2, strain 1)
 333 (Soil control 3, morphotype 3, strain 3)
 A12 (Soil sample A, morphotype1, strain 2)
 B11 (Soil sample B, morphotype1, strain 1)

Etc...



Resultados de la limpieza y concentración de los productos de PCR

Tabla 7. Pureza y concentración de ADN extraído de las PCRs de las muestras de tierra S1, S2, S3, SA, and SB.

Muestra	Pureza 260/280	Concentración (ng/μL)
c. positivo Kit	1,921	26,276
c. positivo lab.	1,982	21,439
A11	2,013	5,288
A12	1,901	25,333
A13	1,947	23,639
A21	1,963	21,795
A31	1,901	23,353
A41	1,904	26,138
A51	1,909	25,601
A52	1,893	27,487
A61	1,952	26,384
A62	1,903	21,731
A71	1,944	22,578
A72	1,981	20,464
B11	1,867	26,454
B12	1,79	25,613
B13	1,914	31,529
B21	1,922	29,406
B22	1,96	20,119
B23	1,901	23,195
B31	1,932	24,543
B32	1,944	26,198
B33	1,949	24,599
B41	1,903	28,288
B42	1,915	24,801
B43	1,919	15,401
111	1,974	23,734
112	1,9	23,455
113	1,973	22,922
121	1,961	15,321
122	1,889	20,577
131	1,809	17,752
132	1,957	18,675
133	1,951	25,478

141	1,961	20,794
142	1,882	21,056
151	1,993	23,752
152	1,956	23,489
153	1,927	23,013
211	1,884	30,776
212	1,93	24,344
213	1,92	26,347
221	1,965	24,08
222	1,908	25,524
223	1,992	19,485
311	1,976	16,121
312	1,86	16,056
313	1,742	25,501
321	1,908	17,78
322	1,926	22,561
323	1,933	18,322
331	1,832	20,493
332	1,922	15,95
333	1,974	14,344

Secuenciación de 16S rDNA

Los productos de PCR fueron secuenciados siguiendo las instrucciones del proveedor. Los resultados, usando los primers “forward” y “reverse” son mostrados en el anexo 3.

1.1.2 Análisis estadístico de las secuencias de los ADNr 16S de los distintos morfotipos bacterianos aislados de muestras control de tierra.

Basandose en las secuencias obtenidas de los diferentes morfotipos de todas las muestras establecemos 9 haplotipos diferentes:

Haplotype 1: A.1.1, A.1.2, A.1.3, 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3

Haplotype 2: A.3.1, B.2.1, B.2.2, B.2.3, 1.4.1, 1.4.2

Haplotype 3: A.2.1, B.3.1, B.3.2, 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 3.1.1, 3.1.3

Haplotype 4: A.4.1

Haplotype 5: A.7.1, A.7.2

Haplotype 6: A.6.1, A.6.2, B.1.1, B.1.2, B.1.3, 1.2.1, 1.2.2, 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3

Haplotype 7: B.4.1, B.4.2, B.4.3, 1.5.1, 1.5.2, 1.5.3, 3.1.2, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3

Haplotype 8: 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3

Haplotype 9: 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3

Tabla 8. Matriz de datos mostrando la distribución de haplotipos en las muestras control de tierra (1: Presencia de haplotipo en la muestra; 0: ausencia de haplotipo en la muestra).

Suelo	HAPLOTIPO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Suelo control A	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Suelo control B	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Suelo control 1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Suelo control 2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Suelo control 3	0	1	1	0	0	0	1	0	1

El análisis estadístico fue llevado a cabo de acuerdo con el anexo 3. La matriz binaria (ver Tabla 8) se generó tras un análisis multidimensional (PROXCAL), utilizando distancias euclideas, así como un análisis de grupos usando IBM SPSS Statistics v21 para determinar la similaridad entre los perfiles.

- **Resultados del análisis estadístico.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de grupos, “Suelo control B” está mas cerca a “Suelo control 1” que a “Suelo control 2” o “Suelo control 3”, mientras que “Suelo control A” podría no ser considerada como cercano a ninguna de las muestras analizadas (ver Figuras 7 y 8). Estos resultados fueron confirmados por PROXCAL (ver Figura 8) mostrando una muy baja desviación típica (0,01156) y coeficiente de Tucker (0,99950).

Estos resultados están en concordancia con la información de las muestras recibidas, ya que la muestra A fue la misma que la S1, la muestra B fue una mezcla de la S1 y la S3, y la S2 fue de un origen distinto.

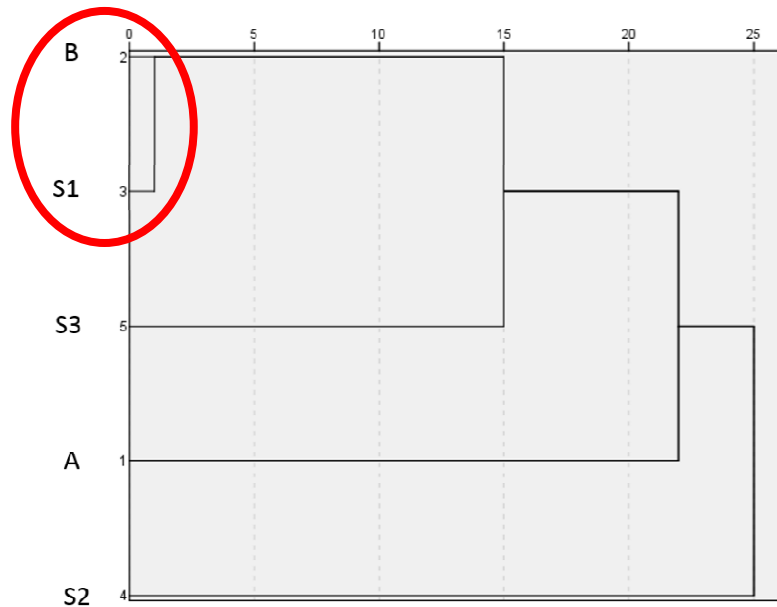


Figura 7. Dendrograma obtenido por analisis de grupo (SSPS). A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.



Figura 8. Multidimensional scaling (PROXCAL) usando distancias Euclideas. A, Suelo control A; B, Suelo control B; S1, Suelo control 1; S2, Suelo control 2; S3, Suelo control 3.

Análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento de los resultados se empleó los programas GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, USA), T-Align (<http://inismor.ucd.ie/talign/index.html>), MS Excel y SPSS v22 (IBM).

Los datos se importaron en GeneMapper y se analizaron con la opción AFLP. El tamaño de los máximos se seleccionó en el rango entre 100–500 bp y con intensidades de fluorescencia de 100 RFU, sin normalización. Las tablas con los fragmentos se exportaron a MS Excel y se editaron en T-Align. T-align es un programa diseñado para obtener un único perfil consenso a partir de diferentes perfiles de una muestra y posteriormente alinear dichos perfiles consenso. Es un programa que para compensar las diferencias en las intensidades de los máximos obtenidos para cada banda en cada perfil, normaliza las áreas, para ello, divide cada área de la banda de un perfil por la suma total de las áreas obtenidas en dicho perfil.

Para determinar la similitud entre los perfiles consenso de cada grupo de suelos, se calcularon las distancias Euclideas y de Bray-Curtis de una matriz de datos correspondiente a la presencia/ausencia de bandas (0/1) en dichos perfiles. Posteriormente se utilizó el paquete estadístico SPSS, usando el análisis multifactorial PROXCAL, para las distancias euclideas y el paquete de macros para el programa EXCEL (Microsoft) denominado Poptools (<http://www.cse.csiro.au/poptools>), para las distancias de Bray-Curtis.

Secuencias parciales del gen 16S rDNA (Secuencia “forward” y “reverse” de cada una de las cepas consideradas)

POSITIVE KIT Control

>615-PositiveKit(c)_ (Forward-seq)

TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCA
AGACCAAAGAGGGGGACCTTAGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACT

>616-PositiveKit(c)(Reverse-seq)

TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGcTTCGCTGACGAGTGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCA
AGACCAAAGAGGGGGACCTTAGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCAC-GGCTaaCT

POSITIVE LABORATORY Control

>617-Positive(c)(Forward-seq)

CgAaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

>618-Positive(c)(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT

MORPHOTYPES Soil sample A

>619-A.1.1(c)(Forward-seq)

GCTGnCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACcAAAGAAGAGcTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTTTTCA
GACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTA
ACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGA
AAGCCCCGGCTAACTACGT

>620-A.1.1(c)(Reverse-seq)

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTaAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCgCCGGGATgaCCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGa
AaGCcCcGgCTAaCTaCGT

>621-A.1.2(c)(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGT
TTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTAACTACG

>622-A.1.2(c)(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGT
TTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTAaCTaCg

>623-A.1.3(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT

AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
 AAAGCCCCGGCTA

>673-A.1.3(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTTTTC
 AGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGaCCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
 AAAGCccCGGCTA

>624-A.2.1(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
 TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGAC
 GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTAC

>674-A.2.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
 TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGAC
 GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTaACTac

>625-A.3.1(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
 CTGAACCGCATGGTTCAAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
 GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTACGT

>675-A.3.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
 CTGAACCGCATGGTTCAAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
 GGTACCTAACCAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT

>626-A.4.1(Forward-seq)

CgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGAT
 TGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACG
 GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTACGT

>676-A.4.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGA
TTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT

>627-A.5.1(Forward-seq)

GAacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT
ATGTCACCTCATGGTGACATGCTGAAAGACGGTCTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTaGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGAC
GGTCCCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

>677-A.5.1(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT
ATGTCACCTCATGGTGACATgcTGAAAGACGGTcTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAcTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCaCAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGACCAAGTcCAGTAGTAAGTgGCTGTACCTtGACGG
TCCCTTAtAGAAAGCCacGGctaACTaCgT

>628-A.5.2(Forward-seq)

GAacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT
ATGTCACCTCATGGTGACATaCTGAAAGACGGTCTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGAC
GGTCCCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

>678-A.5.2(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT
ATGTCACCTCATGGTGACATACTGAAAGACGGTCTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTtGACG
GTcCCTTAtAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT

>629-A.6.1(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC

>679-A.6.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG

GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAaccccgCtaacTACgTgCc

>630-A.6.2(Forward-seq)

aaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCT
TTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAAC
GAGAAAGCCCCGGCTAACTACGT

>680-A.6.2(Reverse-seq)

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCT
TTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAAC
GAGAAAGccCCGGCTAACTaCgT

>631-A.7.1(Forward-seq)

acgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAaCAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATC
TCTTTTGCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGA
CGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTAC

>681-A.7.1(Reverse-seq)

ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAAT
CTCTTTTGCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGA
CGGTACCTTATTAGAAAGCCAcGGCTAaCTaC

>632-A.7.2(Forward-seq)

aCgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATC
TCTTTTGCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGA
CGGTACCTTATTAGAAAGCCAcGGCTAaCTaC

>682-A.7.2(Reverse-seq)

ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAAT
CTCTTTTGCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGA
CGGTACCTTATTAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCg

MORPHOTYPES Soil sample B

>633-B.1.1(Forward-seq)

CgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCT
TTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAAC
GAGAAAGCCCCGGCTAACTACGT

>683-B.1.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTC
TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAgccCCGGCTaACTaCgT

>634-B.1.2(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGT

>684-B.1.2(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAgccCCGGCTaACTaCgT

>635-B.1.3(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTAACTACG

>685-B.1.3(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTT
CTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAgccCCGGCTaACTaCg

>636-B.2.1(Forward-seq)

CgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTC

TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

>686-B.2.1(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
CTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTaCgT

>637-B.2.2(Forward-seq)

CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
CTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTaCgT

>687-B.2.2(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
CTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAaCTaCgT

>638-B.2.3(Forward-seq)

gaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTC
TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

>688-B.2.3(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTC
TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTaACTaCgT

>639-B.3.1(Forward-seq)

CgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT

GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
TACCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
>689-B.3.1(Reverse-seq)
CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTAACCAAGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT
>640-B.3.2(Forward-seq)
GAaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
TACCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
>690-B.3.2(Reverse-seq)
GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
TACCTAACCAAGAAAGCcAcGGCTAaCTaCgT
>642-B.4.1(Forward-seq)
CgaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGA
TCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGG
CCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTC
TTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAG
AAAGCCACGGCTAACTACGT
>692-B.4.1(Reverse-seq)
CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATG
ATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACG
GCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGG
TCTTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAG
AGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT
>643-B.4.2(Forward-seq)
CgaacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGA
TCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGG
CCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTC
TTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAG
AAAGCCACGGCTAACTACGT
>693-B.4.2(Reverse-seq)

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
 ACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATG
 ATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACG
 GCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGG
 TCTTCGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACG
 AGAAAGCCAcGGCTAaCTaCgT

>644-B.4.3(Forward-seq)

gaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
 GTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGAT
 CTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGC
 CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCT
 TCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGT

>694-B.4.3(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
 CGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGA
 TCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGG
 CCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTC
 TTCGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAG
 AAaGCCaCGGCTaACTaCgT

MORPHOTYPES Soil control 1

>111F

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGA
 ACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGC

>111R

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGA
 ACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGC

>112F

CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAAC
 CGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
 AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT
 AACCAGAAAGCCACGGCTAAC

>112R

CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAAC
 CGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT

AACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT
 AACCAGAAAGCC-CGGCTAac

>647-1.1.3(Forward-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
 TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGT
 GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
 TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT

>697-1.1.3(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
 TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGT
 GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
 TACCTAACCAGAAAGCCAcGgctaaCT

>648-1.2.1(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
 AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAACGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
 AAAG

>698-1.2.1(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
 AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAACGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
 AAag

>649-1.2.2(Forward-seq)

GAacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTC
 TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAAC
 GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
 CGAGAAAGCCCCGGCTAACT

>699-1.2.2(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTC
 TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAAC

GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGacCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCccCGGCTAaCT
>650-1.3.1(Forward-seq)
CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AAAGCCCCGGCTAACT
>700-1.3.1(Reverse-seq)
CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AAAGCccCGGCTAaCT
>651-1.3.2(Forward-seq)
GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
GACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
ACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AAGCCCCGGCTAACT
>701-1.3.2(Reverse-seq)
GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
GACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
ACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AaGccCCGGCTAaCT
>652-1.3.3(Forward-seq)
CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AAAGCCCCGGCTAACT
>702-1.3.3(Reverse-seq)
CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTC
AGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAG
AAAGCccGGCTAaCT
>653-1.4.1(Forward-seq)

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG
 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAA
 CCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCA

>703-1.4.1(Reverse-seq)

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG
 AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAA
 CCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCa

>654-1.4.2(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGA
 ACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCACGGC

>704-1.4.2(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGA
 ACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
 TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGgCGGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCAcGGC

>655-1.5.1(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
 GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCGACGATAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
 CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
 AAGCCACGGCTA

>705-1.5.1(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
 GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCGACGATAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
 CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
 AGCCAcGGCTA

>656-1.5.2(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGaGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA
 GGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTG
 AAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG

GGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTC
 GGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
 AGCCACGGCTA
 >706-1.5.2(Reverse-seq)
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGATCT
 GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
 CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
 AGCCACGGCTA
 >657-1.5.3(Forward-seq)
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGATCT
 GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
 CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
 AAGCCACGGCTA
 >707-1.5.3(Reverse-seq)
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGATCT
 GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
 CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
 AAGCCACGGCTA

MORPHOTYPES Soil control 2

>658-2.1.1(Forward-seq)
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTT
 GAACCGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
 ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT
 >708-2.1.1(Reverse-seq)
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTT
 GAACCGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
 ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT
 >659-2.1.2(Forward-seq)
 ACCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTT
 TGAACCGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG

CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAAGCCACGGC

>709-2.1.2(Reverse-seq)

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTT
TGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAAGCCACGGC

>660-2.1.3(Forward-seq)

GAaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACAT
TTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTA

>710-2.1.3(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACAT
TTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAAGCCAcGGCTA

>661-2.2.1(Forward-seq)

GAaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTT
TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTA

>711-2.2.1(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTT
TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTA

>662-2.2.2(Forward-seq)

aaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTT
TTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAAC
GAGAAAGCCCCGGCTA

>712-2.2.2(Reverse-seq)

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTT
TTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAAC
GAGAAAGCCcGGCTA

>663-2.2.3(Forward-seq)

gaaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTT
TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCCCGGCTA

>713-2.2.3(Reverse-seq)

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTT
TTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGAGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAA
CGAGAAAGCCcGGCTA

MORPHOTYPES Soil control 3

>664-3.1.1(Forward-seq)

aaCGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
TACCTAACAGAAAGCCACGGCTA

>714-3.1.1(Reverse-seq)

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGG
TACCTAACAGAAAGCCAcGGCTA

>665-3.1.2(Forward-seq)

AacGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGgGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TAGGCAACCTGCCTCTCAgACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGACgATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGACAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTC
GGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACgAGAAA
GCCACGGC

>715-3.1.2(Reverse-seq)

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGAT
CTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGC

CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCT
TCGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTgACGAGA
AAGCCaCGGC

>666-3.1.3(Forward-seq)

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGgAcAgAtGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
GTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAAC
CGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTA

>716-3.1.3(Reverse-seq)

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAAC
CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCaCGGCTA

>667-3.2.1(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGtCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA
GGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTG
AAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTA
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTC
GGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
AGCCACGGCTA

>717-3.2.1(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
AGCCAcGGCTA

>668-3.2.2(Forward-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
AAGCCACGGCTA

>718-3.2.2(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCT
GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT

CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAA
AGCCAcGGCTA

>669-3.2.3(Forward-seq)

acGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGtCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
AGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGATCT
GAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGA
AAGCCA

>719-3.2.3(Reverse-seq)

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTGGATCGCATGATC
TGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCC
TACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGAcGAGAAa
GCcA

>670-3.3.1(Forward-seq)

CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGtAACAGGAAGACAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTA
ACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
GGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCA
GAAGAAGCACCGGC

>720-3.3.1(Reverse-seq)

CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAcAGCTTGCTGcTTTcGCTGACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTA
ACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
GGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAaTACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCa
GAAGAAGCACcGGC

>671-3.3.2(Forward-seq)

TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGtAACAGGAAGACAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCG
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCACCGGC

>721-3.3.2(Reverse-seq)

TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAaGAcAGCTTGCTGcTTTGCTGACGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCG
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAaTACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCaGAAG
AAGCACcGGC

>672-3.3.3(Forward-seq)

```

CGcTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGtAACAGGAAGACAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC
GCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAA
CGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG
AAGAAGCACCGGC
>722-3.3.3(Reverse-seq)
CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAcAGCTTGCTGcTTTGCTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC
GCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTTGGTGGGGTAA
CGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAaTaCCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCaG
AAGAAGCACcGGC

```

2. SELECCIÓN MUESTRAS DE TIERRAS ESPAÑOLAS PARA SER REMITIDAS A DIFERENTES LABORATORIOS DEL CONSORCIO MiSAFE, Y ESTUDIO POR T-RFLP.

2.1 Toma de muestras de suelos.

De acuerdo a las instrucciones que se contemplan en el WP2 del Proyecto MiSAFE, se han tomado un total de 81 muestras de suelo seco cribado que corresponden a 9 diferentes áreas geográficas (Figura 9, Tabla 9). De cada área geográfica se tomaron tres muestras en una zona de 100 m de diámetro alrededor del punto a peritar (Figura 10). Cada una de las 27 muestras (9 áreas geográficas por 3 puntos de toma) se tomó por triplicado en tubos estériles.



Figura 9. Distribución geográfica de la toma de muestras en España.

AREA	Location		Date	Dry sieved soil (g)
	Geolocation	Reference number		
1. A Coruña	43°23'05.1"N/ 8°23'41.0"W	1.1	31/01/2015	147.72
	43°23'14.0"N/ 8°23'51.5"W	1.2		145.79
	43°23'11.2"N/ 8°23'52.0"W	1.3		208.28
2. Oviedo	43°33'25.10"N/ 6°5'21.27"W	2.1	15/02/2015	225.56
	43°33'47.23"N/ 6°4'53.94"W	2.2		217.98
	43°33'32.09"N/ 6°5'4.7"W	2.3		233.87
3. Barcelona	41°04'54.9"N/ 1°06'18.8"E	3.1	23/02/2015	530.22
	41°04'54.7"N/ 1°06'18.9"E	3.2		432.84
	41°04'54.2"N/ 1°06'19.8"E	3.3		719.82
4. Riobobos (Cáceres)	39°56'14.5"N/ 6°18'43.1"W	4.1	24/01/2015	267
	39°56'14.5"N/ 6°18'40.6"W	4.2		387.24
	39°56'14.5"N/ 6°18'39.8"W	4.2		146
5. Alcalá de Henares (Madrid)	40°30'34.1"N/ 3°20'28.9"W	5.1	21/01/2015	428.4
	40°30'34.1"N/ 3°20'26.8"W	5.2		358
	40°30'34.1"N/ 3°20'27.1"W	5.3		672.33
6. Valencia	39°44'08.8"N/ 0°34'58.7"W	6.1	24/02/2015	538.33
	39°44'08.2"N/ 0°34'59.6"W	6.2		517.41
	39°44'09.6"N/ 0°34'56.8"W	6.3		521.52
7. Huelva	37°22'23.6"N/ 6°55'28.2"W	7.1	05/03/2015	561.03
	37°22'27.6"N/ 6°55'31.5"W	7.1		669.67
	37°22'24.0"N/ 6°55'29.5"W	7.3		751.24
8. Granada	37°23'58.45"N/ 3°33'11.49"W	8.1	01/02/2015	275.3
	37°24'0.41"N/ 3°33'12.88"W	8.2		49.75
	37°23'59.01"N/ 3°33'12.94"W	8.3		41.75
9. Almería	36°44'55.6"N/ 2°47'33.9"W	9.1	05/03/2015	604.47
	36°44'55.3"N/ 2°47'33.5"W	9.2		435.76
	36°44'56.2"N/ 2°47'33.4"W	9.3		546.87

Figura 10. Toma de muestras.

Table 9. Área geográfica, geolocalización y total de muestra tamizada almacenada en nuestros laboratorios.

Muestra	REPLICAs				OBSERVACIONES
Control -					Solo reactivos
Control +					<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35
1-A Coruña (Ac)	Ac1.1	1.1.1	1.1.2	1.1.3	
	Ac1.2	1.2.1	1.2.2	1.2.3	
	Ac1.3	1.3.1	1.3.2	1.3.3	
2-Oviedo (Asturias) (As)	As2.1	2.1.1	2.1.2	2.1.3	
	As2.2	2.2.1	2.2.2	2.2.3	
	As2.3	2.3.1	2.3.2	2.3.3	
3-Barcelona (B)	B3.1	3.1.1	3.1.2	3.1.3	
	B3.2	3.2.1	3.2.2	3.2.3	
	B3.3	3.3.1	3.3.2	3.3.3	
4-Riolobos (Cáceres) (C)	C4.1	4.1.1	4.1.2	4.1.3	
	C4.2	4.2.1	4.2.2	4.2.3	
	C4.3	4.3.1	4.3.2	4.3.3	
5-Alcalá de Henares (Al)	Al5.1	5.1.1	5.1.2	5.1.3	
	Al5.2	5.2.1	5.2.2	5.2.3	
	Al5.3	5.3.1	5.3.2	5.3.3	
6-Valencia (V)	V6.1	6.1.1	6.1.2	6.1.3	
	V6.2	6.2.1	6.2.2	6.2.3	
	V6.3	6.3.1	6.3.2	6.3.3	
7-Huelva (H)	H7.1	7.1.1	7.1.2	7.1.3	
	H7.2	7.2.1	7.2.2	7.2.3	
	H7.3	7.3.1	7.3.2	7.3.3	
8-Granada (G)	G8.1	8.1.1	8.1.2	8.1.3	
	G8.2	8.2.1	8.2.2	8.2.3	
	G8.3	8.3.1	8.3.2	8.3.3	
9-Almeria (Am)	Am9.1	9.1.1	9.1.2	9.1.3	
	Am9.2	9.2.1	9.2.2	9.2.3	
	Am9.3	9.3.1	9.3.2	9.3.3	

ANEXOS B, C, D, F

“Validación de la técnica T-RFLP de microorganismos del suelo para aplicación forense”.

Obtención de los T-RFLP de ADN bacteriano de suelo

1. RECEPCIÓN MUESTRAS

(1) Suelos A, B, 1, 2, 3. **(2)** Suelos escoceses: Rathen, Rothansted, Daumlithie, Ardallie, Hutton. **(3)** Suelos de Guyana.

MUESTRAS					FECHA
Suelo muestra A	Suelo muestra B	Suelo control 1	Suelo control 2	Suelo control 3	10-12-2014
Ref. suelo Rathen RT(891520)	Ref. suelo Rothansted R*	Ref. suelo Daumlithie D(891403)	Ref. suelo Ardallie A(891509)	Ref. suelo Hutton H(1148190)	
1 (0 metros-1)	2 (0 metros-2)	3 (0 metros-3)	4 (600 metros -1)	5 (600 metros -2)	29-06-2014 ADN Suelos Guyana
6 (600 metros -3)	7 (1200 metros -1)	8 (1200 metros -2)	9 (1200 metros -3)	10 (1800 metros -1)	
11 (1800 metros -2)	12 (1800 metros -3)	13 (2400 metros -1)	14 (2400 metros -2)	15 (2400 metros -3)	
16 (3000 metros -1)	17 (3000 metros -2)	18 (3000 metros -3)			

Los resultados de los Suelos A, B, 1, 2 y 3 se muestran en el **ANEXO B**.

*No recibimos número de referencia para las muestras de Rothansted.

(4) Suelos Israel

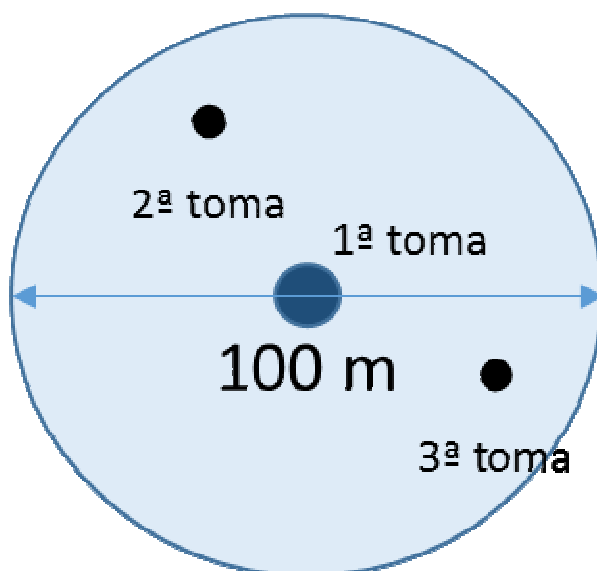
MUESTRAS SUELOS ISRAEL	Número referencia	FECHA
R1	R1.1	08-03-2015
	R1.2	
	R1.3	
R2	R2.1	
	R2.2	
	R2.3	
R3	R3.1	
	R3.2	
	R3.3	
S1	S1.1	
	S1.2	
	S1.3	
S2	S2.1	
	S2.2	
	S2.3	
S3	S3.1	
	S3.2	
	S3.3	
T1	T1.1	
	T1.2	
	T1.3	
T2	T2.1	
	T2.2	
	T2.3	
T3	T3.1	
	T3.2	
	T3.3	

(5) Suelos de España

MUESTRAS SUELOS ESPAÑA	Número referencia	FECHA
A Coruña	1.1	31-01-2015
	1.2	
	1.3	
Oviedo	2.1	15-02-2015
	2.2	
	2.3	
Barcelona	3.1	23-02-2015
	3.2	
	3.3	
Riolobos (Cáceres)	4.1	24-01-2015
	4.2	
	4.3	
Alcalá de Henares	5.1	21-01-2015
	5.2	
	5.3	
Valencia	6.1	24-02-2015
	6.2	
	6.3	
Huelva	7.1	05-03-2015
	7.2	
	7.3	
Granada	8.1	01-02-2015
	8.2	
	8.3	
Almeria	9.1	05-03-2015
	9.2	
	9.3	

2. PROTOCOLO TOMA DE MUESTRAS DE ESPAÑA

- Se localizaron vía GPS las coordenadas del lugar donde se tomaron las muestras (utilizar la aplicación Maps, localización, pulsar en la parte inferior donde aparecen coordenadas).
- Fotografiar el lugar de la toma de muestras (nos valen las del teléfono).
- Retirar los restos orgánicos (vegetación, etc...) presente sobre la superficie. Utilizar la pala limpia.
- Coger la tierra superficial con la pala no sobrepasando los primeros 5 centímetros de profundidad. Abrir los botes de plástico en el momento de introducir la tierra. Llenar el bote de plástico de tierra.
- Tomar otras dos muestras del mismo modo (tres en total) a una distancia de entre 10 y 100 metros de la toma inicial.



3. METODOLOGÍA ANEXOS B-F

3.1. Extracción de DNA

Se ha utilizado el kit PowerSuelo® DNA Isolation Kit (Ref. 12888, MO BIO Laboratories, INC.) para la extracción del DNA cromosómico total de las muestras de suelo, siendo necesario el uso de:

- Micropipetas y puntas irradiadas libres de DNA, RNA y proteínas
- Báscula de precisión
- Campana de flujo laminar
- Microcentrífuga
- Nevera a 4 °C
- PowerBead Tubes (contienen un tampón que facilita la dispersión del suelo, la solubilización de los ácidos húmicos y protege el DNA de la degradación)
- 2 ml Collection Tubes
- Spin Filters
- Vórtex y Vortex Adapter
- Agua bidestilada
- Espátula esterilizada con U.V. en el CrossLinker
- Congelador a -20 °C

El kit se suministra con los siguientes reactivos:

- Solution C1 (con SDS, produce la lisis celular completa; en caso de observar precipitados, calentar a 60 °C para volver a disolver el SDS)
- Solution C2 (precipita componentes del suelo y celulares no DNA)
- Solution C3 (precipita componentes del suelo y celulares no DNA)
- Solution C4 (solución con alta concentración de sal que permite al DNA unirse a la membrana de silica)
- Solution C5 (contiene etanol , retiro impurezas del DNA unido a la membrana)
- Solution C6 (buffer de elución)

Protocolo extracción:

- Pesar 3000 mg de suelo y añadirlos a un **PowerBead Tube**
- Vortex
- Añadir 60 µl de solución **C1** a cada PowerBead Tube
- Agitar los PowerBead Tubes a máxima velocidad de 10 a 20 min
- Centrifugar 30" a 10.000 x g
- Transferir el sobrenadante a un 2 ml Collection Tube (400-500 µl)

- Pipetear 250 µl de solución **C2** y vortex durante 5". Incubar a 4 °C unos 5'
- Centrifugar 1' a 10.000 x g
- Retirar el sobrenadante y depositarlo en un nuevo 2 ml Collection Tube (no más de 600 µl)
- Poner 200 µl de solución **C3**
- Centrifugar 1' a 10.000 x g
- Pasar el sobrenadante (no más de 750 µl)a un nuevo 2 ml Collection Tube y echar 1200 µl de solución **C4**
- Vortex 5"
- Cargar 675 µl en el Spin Filter y centrifugar a 10.000 x g por 1'
- Descartar el líquido que queda en el tubo (repetir estos dos últimos pasos hasta que todo el volumen haya pasado por el Spin Filter
- Añadir 500 µl de solución **C5** y centrifugar 30" a 10.000 x g
- Descartar el líquido del Spin Filter
- Centrifugar 1' a 10.000 x g
- Cambiar el filtro a un nuevo 2 ml Collection Tube
- Depositar 100 µl de agua bidestilada en el centro de la membrana
- Centrifugar 30" a 10.000 x g
- Retirar el filtro
- Congelar la muestra, en la que tendremos hasta un máximo de 25 µg de DNA

Se ha efectuado un control negativo (sólo con reactivos) en cada extracción realizada.

3.2. Concentración y limpieza del ADN

Para concentrar y limpiar las extracciones de DNA genómico, se ha utilizado el kit "DNA Clean & Concentrator™ -25" (Ref. D4006; Zymo Research), siendo necesario el uso de:

- Micropipetas y puntas irradiadas libres de DNA, RNA y proteínas
- Campana de flujo laminar
- Una microfuga
- Zymo-Spin™ Column
- Collection Tube
- Vórtex
- Agua bidestilada
- Congelador a -20 °C

El kit se suministra con los siguientes reactivos:

- DNA Binding Buffer
- DNA Wash Buffer

Protocolo limpieza ADN extracción:

- Añadimos 2 volúmenes de DNA Binding Buffer por volumen de DNA extraído (200 µl)
- Vortex
- Colocar el Zymo-Spin TM Column en un Collection Tube, y transferir la extracción y el buffer a la columna
- Centrifugar 1' a máxima velocidad
- Descartar el filtrado y recolocar la columna
- Poner 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Descartar el filtrado, y colocar la columna en el anterior Collection Tube
- Poner 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Descartar el filtrado, y colocar la columna en un nuevo Collection Tube
- Pipetear 29 µl agua bidestilada en el centro de la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Retirar la membrana
- Valorar la concentración y pureza de DNA de la muestra (2 µl)

3.3. PCR con marcadores fluorescentes

Se han utilizado los cebadores 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y el 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'), marcados ambos con 6FAM en 3'.

Reactivos y materiales:

- Termociclador Eppendorf™
- Tubos Eppendorf de 200 µl autoclavados
- Micropipetas y puntas libres de DNA, RNA y proteínas
- Agua bidestilada
- Campana de flujo laminar (todo el proceso en campana y con guantes)
- Vórtex
- Primers: vienen liofilizados, con los moles que contienen, y con agua se resuspenden a una concentración de 10 µM
- Polimerasa TaqI Master mix 2x (Ref. D118)
- Aislamientos DNA previos.

Protocolo PCR:

- Añadimos 37 µl de TaqI master mix un Eppendorf de 200 µl

- 2 µl de cada primer (concentración final 0,4 µM)
- 300 ng de aislamiento de DNA hasta un máximo de 9 µl. No se añade ADN en control negativo y de microorganismo de colección para el control positivo.
- Agua bidestilada hasta completar 50 µl (9 µl en el control negativo de PCR)
- Agitamos bien todos los tubos para que se mezclen los reactivos (vortex) y le damos un spin.
- Colocamos los tubos en el termociclador con el programa previamente configurado para que presente los siguientes ciclos:

30 ciclos	{	- 95 °C, 5 minutos (desnaturalización inicial)
		- 94 °C, 45 segundos (desnaturalización)
		- 55 °C, 50 segundos (anillamiento primers)
		- 60 °C, 30 segundos (extensión del molde)
		- 72 °C, 3 minutos (extensión del molde)
		- 72 °C, 10 minutos (extensión final)
		- 10 °C, por tiempo indefinido para mantener la amplificación

Por último comprobaremos si la reacción ha sido correcta con un gel (1,6% agarosa Biotools MB™, en tampón TAE, con separación óptima de 400-7000pb) durante 15 minutos de carrera. Cargaremos 2 µl de cada reacción, el amplicón tiene un tamaño de ≈ 566 pb.

3.4. Digestión de ADN de cadena sencilla o doble cadena protuberante procedente de la PCR

Reactivos y materiales:

- Mung Bean Nuclease (New Engly BioLabs, Ref. M0250S)
- 0,6 µl de Mug Bean Enzyme. Cada reacción requiere 10 U/ µl.
- 4 µl de tampón de reacción (10X nuclease reaction buffer)
- 36 µl de agua bidestilada
- 40 µl PCR
- SDS al 10 % estéril.

Protocolo digestión con enzima Mung:

- Incubamos 30 min a 30 °C
- 2 µl SDS al 10 % (para parar la reacción)

3.5. Limpieza digestión con Mung y cuantificación ADN.

Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, Ref. A9281/A9282))

Reactivos y materiales:

- Micropipetas y puntas irradiadas libres de DNA, RNA y proteínas
- Campana de flujo laminar
- Una microfuga
- SV Minicolumn
- Collection Tube
- Vórtex
- Nuclease-Free Water
- Nevera a 4 °C

Protocolo limpieza:

- Añadir un volumen a la reacción (80 µl) de Membrane Binding Solution
- Colocar el SV Minicolumn en un Collection Tube
- Pasar el producto de PCR a la columna
- Incubar a temperatura ambiente 1'
- Centrifugar 1' a 16.000 x g
- Descartar el filtrado y volver a colocar la membrana
- Añadir 700 µl de Membrane Wash Solution (Ethanol Added) a la membrana
- Centrifugar 1' a 16.000 x g
- Descartar filtrado
- Añadir 500 µl de Membrane Wash Solution (Ethanol Added) a la membrana
- Centrifugar 5' a 16.000 x g
- Vaciar el Collection Tube y poner de nuevo la membrana con la tapa abierta (evaporar etanol) y centrifugar 1' a 16.000 x g
- Poner la Minicolumn en un nuevo Collection Tube
- Añadir 50 µl de Nuclease-Free Water a la membrana
- Centrifugar 1' a 16.000 x g
- Retirar la columna y guardar a 4 °C
- Comprobar la concentración de DNA

3.6. Digestión de productos de la PCR**Reactivos y materiales:**

- Nuclease Taqαl – 20 U/ µl (New Engly BioLabs, Ref. R0149S)

Protocolo digestión:

A partir del valor de DNA obtenido, se calcula la cantidad de enzima necesaria (5 U/µg de DNA)

- 48 µl de PCR (todo el volumen)
- Buffer 5X (10X CutSmart Buffer). Volumen variable dependiendo del volume de enzima añadido. Ejemplo: 5,5 µl Buffer
- Se requieren 5 U/µg de ADN. Ejemplo: 1,1 µl de Nuclease Taqαl
- NO AÑADIR AGUA
- Incubar a 65 °C durante 3 horas
- Inactivar la enzima poniendo la reacción a 80 °C, 20 min

3.7. Nueva limpieza y cuantificación del DNA

DNA Clean & Concentrator™ -25 (Ref. D4006; Zymo Research) siendo necesario el uso de:

- Micropipetas y puntas irradiadas libres de DNA, RNA y proteínas
- Campana de flujo laminar
- Una microfuga
- Zymo-Spin TM Column
- Collection Tube
- Vórtex
- Agua bidestilada
- Congelador a -20 °C

El kit se suministra con los siguientes reactivos:

- DNA Binding Buffer
- DNA Wash Buffer

Protocolo limpieza:

- Añadimos 2 volúmenes de DNA Binding Buffer por volumen de DNA extraído (200 µl)
- Vortex
- Colocar el Zymo-Spin TM Column en un Collection Tube, y transferir la extracción y el buffer a la columna
- Centrifugar 1' a máxima velocidad
- Descartar el filtrado y recolocar la columna
- Poner 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Descartar el filtrado, y colocar la columna en el anterior Collection Tube
- Poner 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Descartar el filtrado, y colocar la columna en un nuevo Collection Tube
- Pipetear 29 µl agua bidestilada en el centro de la columna
- Centrifugar 30" a máxima velocidad
- Quitar el filtro
- A 4 °C para procesado rápido, o a -20 °C

3.8. Electroforesis Capilar y Lectura

Realizado en la unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá (CAI Medicina y Biología)

3.9. Análisis de datos.

Se utiliza el programa Gene Marker.

4. RESULTADOS (ANEXOS B, C, D, E, F)

Los resultados de los distintos suelos se muestran en anexos, siguiendo el orden que se muestra a continuación:

- 4.1. Suelos A, B, 1, 2, 3 (**Anexo B**)
- 4.2. Suelos Ardille, Rathen, Rothansted, Daumlithie, Hutton (**Anexo C**)
- 4.3. Suelos Guyana (**Anexo D**)
- 4.4. Suelos Israel (**Anexo E**)
- 4.5. Suelos España (**Anexo F**)

5. ANEXOS B, C, D, E ,F

5.1. ANEXO B (Suelos A, B, 1, 2 y 3)

5.1.1. Extracción ADN

MUESTRA	REPLICAS			OBSERVACIONES
Control -				Sólo reactivos
Control +				<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35*
Suelo control 1	S1	S1'	S1''	S1'' **
Suelo control 2	S2	S2'	S2''	
Suelo control 3	S3	S3'	S3''	S3 **
Suelo muestra A	SA	SA'	SA''	
Suelo muestra B	SB	SB'	SB''	

5.1.2. Limpieza y cuantificación ADN extraído

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	PUREZA Abs 260/280*	PUREZA Abs 260/230**	FECHA
Control -***	-3.3	2.76	0.6	11/12/2014
Control +****	52.3	1.83	3.61	11/12/2014
SA	10.7	1.88	-32.96	11/12/2014
SA'	1.8	1.3	-3.06	11/12/2014
SA''	7.2	2.31	3.3	11/12/2014
SB	3.7	1.94	0.67	11/12/2014
SB'	25.9	2.01	2.72	11/12/2014
SB''	33.0	2.03	3.47	11/12/2014
S1	11.6	2.17	4.92	11/12/2014
S1'	3.4	4.91	-0.94	11/12/2014
S1'' [†]	1.5	1.68	0.21	11/12/2014
S2	43.5	1.89	3.3	11/12/2014
S2'	37.4	1.76	1.31	11/12/2014
S2''	7.8	1.87	-12.27	11/12/2014
S3 [†]	2.8	1.5	0.67	11/12/2014
S3'	34.5	1.92	2.88	11/12/2014
S3''	109.3	1.98	2.53	11/12/2014

5.1.3. PCR y ADN

SUELO	MUESTRA	ADN (ng)*	FECHA
CONTROLES REACCION	Control – PCR reactivos	-	12.12.2014
	Control + PCR	150	
	Control – Extracción y purificación reactivos	-	
Suelo muestra A	SA ₁	53.5	
	SA ₂	53.5	
	SA' ₁	9	
	SA' ₂	9	
	SA'' ₁	36	
	SA'' ₂	36	
Suelo muestra B	SB ₁	18.5	
	SB ₂	18.5	
	SB' ₁	129.5	
	SB' ₂	129.5	
	SB'' ₁	150	
	SB'' ₂	150	

SUELO	MUESTRA	ADN (ng)*	FECHA
CONTROLES REACCION	Control – PCR reactivos	-	18.12.2014
	Control + PCR	150	
	Control – Extracción y purificación reactivos	-	
Suelo control 1	S1	300	
	S1'	300	
	S1''	150	
Suelo control 2	S2 ₁	150	
	S2 ₂	150	
	S2' ₁	150	
	S2' ₂	150	
	S2'' ₁	39	
	S2'' ₂	39	
Suelo control 3	S3	150	
	S3' ₁	150	
	S3' ₂	150	
	S3'' ₁	150	
	S3'' ₂	150	

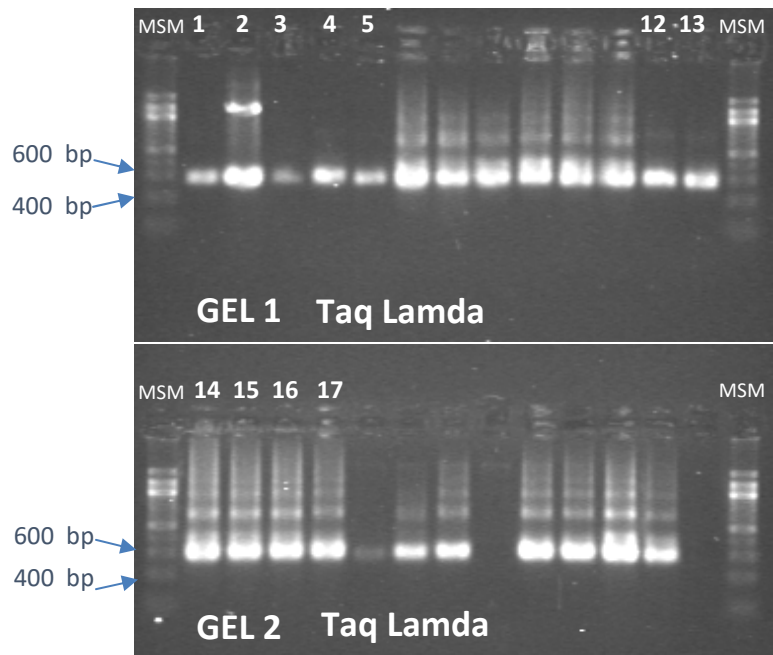
5.1.4. Geles productos PCR

Geles 1 y 2

- 1: Control – PCR reactivos
 2 y 3: Control + (*B. subtilis* DNA)
 4 y 5: Control – extracción reactivos

12 y 13: SB
 14 y 15: SB'
 16 y 17: SB'' } **Suelo muestra B**

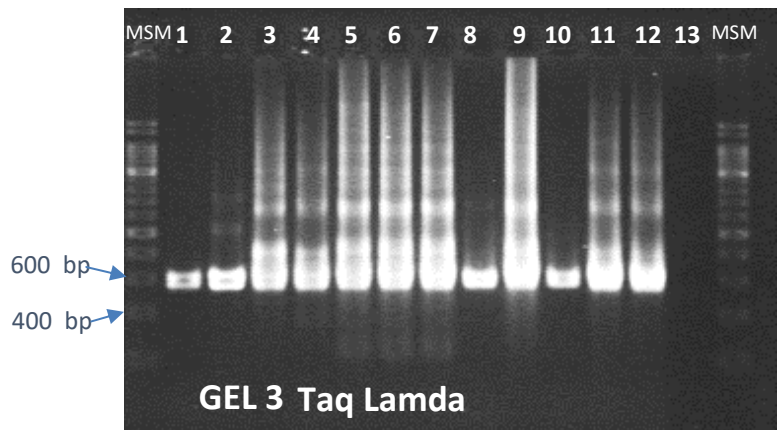
MSM: Molecular Size Marker
 200 pb DNA Ladder (Takara Bio)



Gel 3

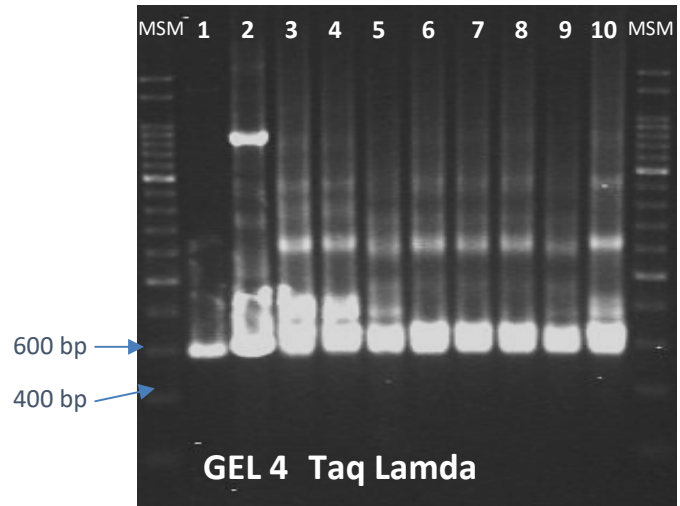
- 1: Control – PCR reactivos
 2: Control + (*B. subtilis* DNA)
 3: S1'
 4: S1'' } **Suelo control 1**
 5: S2
 6: S2'
 7: S2'' } **Suelo control 2**
 8: S3'
 9: S3'' } **Suelo control 3**
 10: Control – extracción reactivos

MSM: Molecular Size Marker
 200 pb DNA Ladder (Takara Bio)



Gel 4

- 1: Control – PCR
 2: Control + (*B. subtilis* DNA)
 3: SA
 4: SA'
 5: SA''
 9: S1
 10: S3
- } **Suelo muestra
A**



5.1.5. Resultados RFLPs

SA.1	SA.2	SA.3	SB.1	SB.2	SB.3
62.74	62.76	62.73	81.92	66.07	66.12
64.26	64.2	64.23	94.07	80.5	78.62
66.04	66.06	65.98	97.57	82.01	80.57
77.96	77.68	79.26	98.47	84.59	81.98
78.77	78.48	80.14	132.45	92.1	84.56
79.31	79.91	80.59	133.49	94.07	92.03
80.12	81.52	81.57	160.26	95.5	94.09
80.75	82.59	82.72	269.59	96.22	95.34
82.54	84.47	95.41	270.16	97.57	96.14
91.29	95.41	96.04	456.65	98.47	97.58
92.02	96.13	96.85	458.87	108.38	98.47
95.28	98.38	97.48	477.11	156.9	100.57
96.0	111.4	98.29	477.93	158.28	101.31
98.36	112.16	103.31	480.55	158.97	108.33
111.41	113.25	154.71		160.34	156.9
112.17	154.72	156.81		181.66	158.2
113.36	155.68	157.85		268.18	159.06
154.67	156.9	158.89		269.56	160.26
155.64	157.77	160.09		270.21	181.63
156.87	158.97	179.49		282.66	268.13
157.75	160.0	181.57		283.31	270.24
179.48	179.51	231.68		285.18	272.02
229.76	181.59	266.79		285.92	282.64

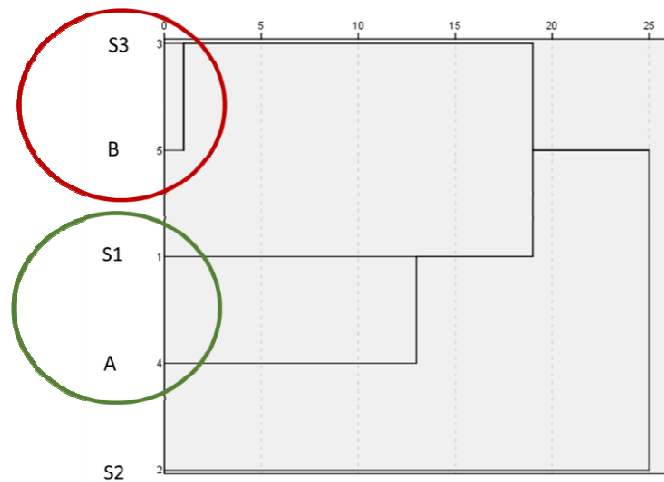
231.71	229.74	268.18	286.89	283.37
266.83	231.68	269.64	287.79	285.15
268.13	266.79	270.29	296.66	285.88
269.59	268.01	271.59	319.82	287.02
276.34	269.55	272.81	456.59	287.83
283.41	270.27	276.31	458.74	296.59
283.9	271.57	277.21	468.27	456.64
284.96	283.39	278.27	477.34	458.7
285.61	285.58	283.47	478.57	468.33
287.32	287.28	285.51	480.54	477.38
294.71	289.3	287.22	496.98	478.6
298.54	317.72	289.42		480.57
302.58	319.72	294.71		496.88
317.77	368.47	296.74		
319.78	370.52	298.53		
368.44	371.81	304.74		
371.72	416.94	319.74		
416.98	419.08	455.52		
453.67	454.65	456.67		
454.72	455.55	458.74		
455.63	456.77	464.41		
456.77	458.75	466.06		
462.44	462.51	467.24		
463.99	464.45	468.19		
464.61	466.09	469.93		
466.17	466.87	496.11		
467.97	467.89	496.88		
472.09	478.53	498.14		
475.78	496.11			
476.66				
478.53				
496.11				

S.1.1	S.1.2	S.1.3	S.2.1	S.2.2	S.2.3	S.3.1	S.3.2	S.3.3
66.03	66.09	62.78	62.81	62.88	62.85	63.04	54.16	63.04
80.6	80.03	66.07	66.07	66.06	66.04	66.14	82.05	66.12
81.84	80.56	79.29	79.97	80.04	66.88	80.57	286.24	69.3
82.73	81.88	80.55	80.59	80.66	77.23	81.99	476.79	80.57
84.42	84.44	81.89	81.92	81.91	79.99	84.66	477.51	82.08
94.07	94.12	82.7	84.42	84.48	80.61	92.04		84.56
96.14	95.36	84.4	92.01	92.04	81.95	94.01		92.13
97.57	96.16	94.12	92.72	92.76	84.45	95.35		92.93
98.29	97.59	95.39	93.98	94.01	91.98	96.15		94.09
100.58	98.39	96.11	95.33	95.35	92.79	97.58		95.52
156.84	113.1	97.56	96.04	96.06	94.05	98.48		96.24
157.79	154.71	98.37	96.85	96.87	96.12	108.37		97.22
158.98	156.81	156.81	98.29	97.49	96.93	156.9		98.48
159.92	157.85	157.77	101.24	98.3	97.56	158.28		108.48
161.27	159.06	158.97	103.32	101.23	98.28	159.14		142.91
181.6	160.08	159.91	113.44	103.3	101.24	160.26		154.85
231.7	161.27	161.19	114.19	111.36	103.31	161.11		155.72
266.81	231.69	181.62	115.46	112.11	113.42	181.66		156.93
268.91	267.92	231.73	119.44	113.2	115.44	268.13		158.3
270.2	268.89	268.08	119.95	115.38	119.5	269.43		159.15
271.49	269.62	269.62	120.8	120.71	120.78	270.24		160.25
272.3	271.64	271.56	122.08	121.98	122.05	272.03		179.51
278.27	286.02	283.47	154.62	144.19	144.19	282.68		181.65
283.36	287.63	285.98	155.67	154.72	155.85	283.33		185.58
286.03	289.41	287.2	156.81	155.68	156.81	285.12		216.29
287.08	368.38	289.38	157.93	156.81	157.85	286.9		218.22
287.64	370.43	296.68	158.88	157.77	158.97	287.8		268.28
289.42	419.06	319.84	160.09	158.97	160.09	294.63		269.08
296.69	456.75	360.93	216.49	160.09	161.02	296.66		270.21
319.85	458.81	362.06	229.74	161.02	165.52	310.69		272.06
370.34	464.49	370.38	231.68	229.73	220.09	319.77		272.78
373.67	468.08	373.73	232.9	231.59	229.82	454.75		277.13
419.08	477.71	419.05	233.87	232.88	231.68	456.58		279.3
454.77	478.68	454.65	235.4	233.85	232.9	458.64		280.35
455.59	480.71	455.56	268.17	235.39	233.87	464.53		282.68
456.64	496.91	456.69	269.38	267.99	235.41	473.96		283.41
458.61	498.16	457.99	270.19	268.8	266.79	475.82		285.26
464.19		458.75	282.66	269.94	268.01	477.52		286.79
465.97		464.45	283.39	271.31	269.96	478.5		287.84
467.06		466.08	284.44	272.53	271.5	480.55		288.72
468.23		467.1	285.5	282.65	272.47	494.87		289.53
469.95		468.12	286.47	283.38	282.62	496.98		294.68

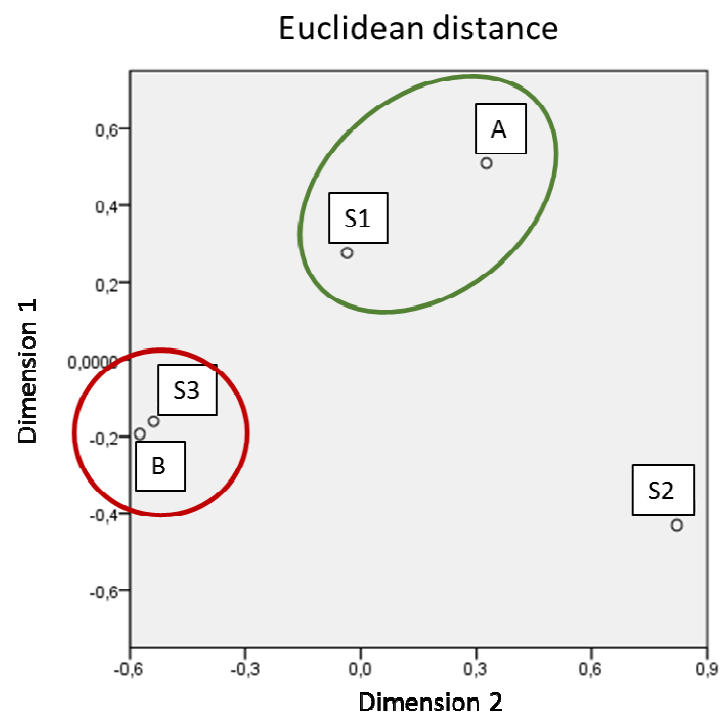
477.74	469.93	287.52	285.57	283.59	498.33	295.57
478.55	473.9	294.65	286.46	285.54		296.7
480.57	475.67	368.43	287.6	286.44		320.03
497.0	476.72	370.48	289.38	287.65		454.76
498.25	477.69	416.91	294.65	289.36		455.44
	478.58	419.06	296.68	294.64		456.42
	480.61	454.65	314.81	296.67		458.38
	496.15	455.71	368.32	297.73		464.26
	496.91	456.69	370.37	298.54		466.35
	498.16	458.6	416.96	314.74		467.36
		462.6	419.03	368.38		468.14
		463.99	455.63	370.43		473.97
		464.53	456.62	373.55		475.89
		466.09	458.6	419.09		477.09
		466.8	461.74	454.74		478.3
		467.66	462.75	456.64		480.33
		468.6	464.06	458.7		494.54
		471.37	464.53	461.7		496.62
		473.29	466.01	462.78		497.96
		478.45	466.79	464.57		
		480.5	467.74	466.05		
		496.59	468.68	466.84		
			469.86	467.94		
			473.21	468.73		
			478.53	469.92		
			480.49	471.35		
			497.36	473.26		
			498.63	474.47		
			475.44			
			477.79			
			478.52			
			480.57			
			489.32			
			497.46			
			498.63			

El “Suelo A” está más cerca del “Suelo 1” que del “Suelo 2” o “Suelo 3”; mientras que el “Suelo B” está más cerca del “Suelo 3”. Estos resultados fueron confirmados con el análisis PROXCAL, mostrando normalized raw stress (0,00636) y Tucker's coefficient (0,99682).

Dendrogram obtained by cluster analysis (SPSS).



Multidimensional scaling (PROXCAL) using Euclidean distances.



5.2. ANEXO C

5.2.1. Extracción ADN

10/Diciembre/2014 y 12/Enero/2015

MUESTRA	REPLICAS			OBSERVACIONES
Control -				Only reactivos
Control +				<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35*
Ref. suelo Rathen	RT	RT'	RT''	
Ref. suelo Rothansted	R	R'	R''	
Ref. suelo Daumlithie	D	D'	D''	
Ref. suelo Ardallie	A	A'	A''	

*La columna fue cargada con una 18-h suspensión de *Bacillus subtilis* CECT 35.

Sólo 200 mg de suelo en vez de 250 mg. * Sólo 50 mg de suelo en vez de 250 mg.

**** Restos de muestra obstruyen la columna.

En todas las extracciones se utilizan control negativo (solo reactivos PCR y cebadores) y positivo (cultivo 18 horas de *Bacillus subtilis* CECT 35)

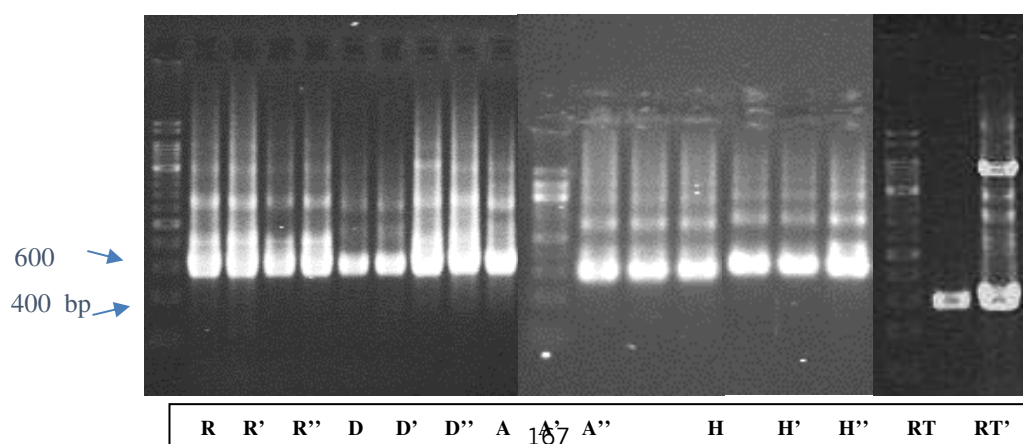
5.2.2. Limpieza ADN y cuantificación

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	PUREZA Abs 260/280*	PUREZA Abs 260/230**	FECHA
Control -	-3.3	2.76	0.6	11/12/2014
Control +	52.3	1.83	3.61	11/12/2014
RT	11.4	2.2	4.21	11/12/2014
RT'	12.4	2.34	3.35	11/12/2014
RT''	4.3	2.56	-2.14	11/12/2014
R	14.9	1.94	1.42	13/01/2015
R'	17.5	1.74	1.09	13/01/2015
R''	12.8	1.66	1.08	13/01/2015
D	27.2	1.49	0.66	13/01/2015
D'	1.0	1.65	0.41	13/01/2015
D''	4.1	1.1	0.75	13/01/2015
A	71.7	1.38	0.87	13/01/2015
A'	38.2	1.48	1.08	13/01/2015
A''	20.4	1.72	1.46	13/01/2015
H	15.8	1.89	1.56	13/01/2015
H'	45.1	1.57	0.81	13/01/2015
H''	8	1.59	0.62	13/01/2015

5.2.3. PCR y ADN

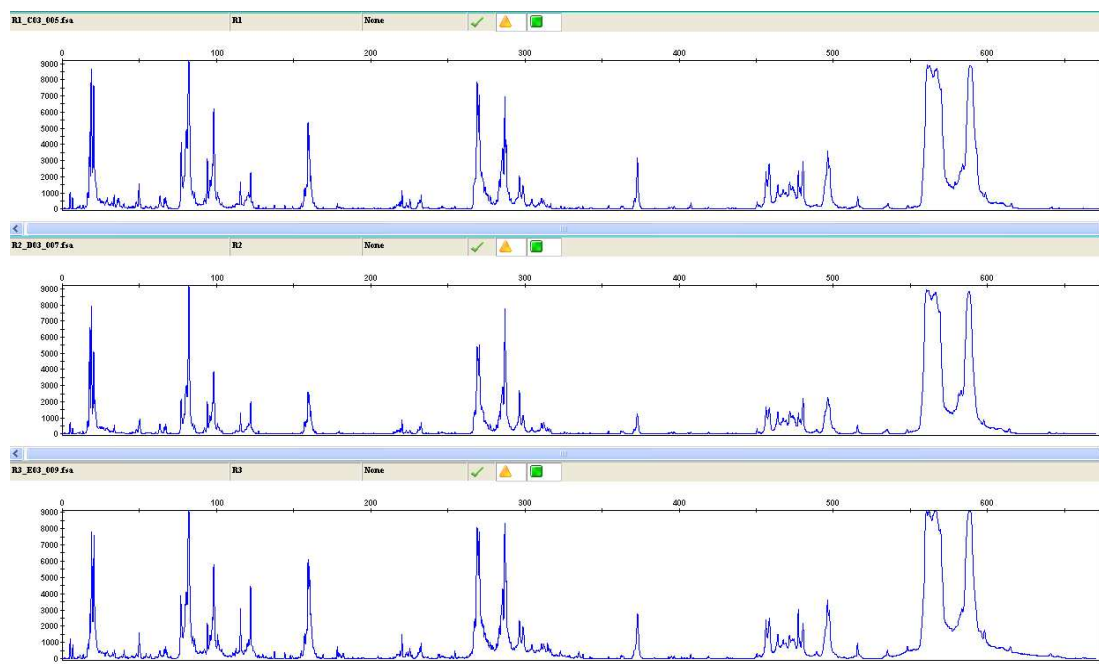
SUELO	MUESTRA	ADN (ng)	FECHA
	Control – PCR reactivos		14-01-2015
	Control +*	150	
Ref. suelo Rothansted (R)	R	149	
	R'	175	
	R''	128	
Ref. suelo Daumlithie (D)	D	272	
	D'	10	
	D''	41	
Ref. suelo Ardallie (A)	A	300	
	A'	300	
	A''	204	
Ref. suelo Hutton (H)	H	300	
	H'	80	
	H''	300	
Ref. suelo Rathen (RT)	RT ₁	57	
	RT' ₁	62	
	RT'' ₁	21.5	

5.2.4. Geles productos PCR



5.2.5. RFLPs

Rothansted:



Fragmentos

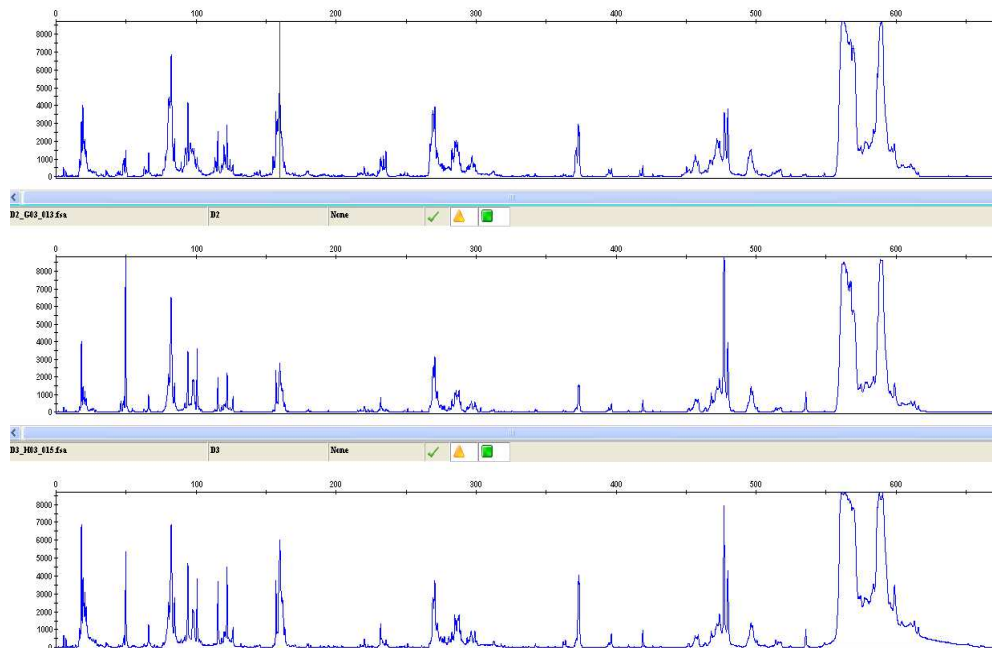
R	R'	R''
63,22	50,23	54,22
66,1	63,26	57,14
67,01	66,05	63
77,02	66,96	64,3
80,37	76,93	65,28
81,69	80,35	66,1
82,31	81,75	67
85,75	84,48	67,74
88,86	85,72	76,74
90,36	91,99	79,8
91,16	93,95	80,41
92,05	95,72	81,73
93,92	97,33	82,25
95,8	98,13	84,62
97,4	100,65	85,76
98,12	101,38	86,99
100,65	103,43	89,28
101,39	112,48	91,14
103,36	115,47	92,11
110,55	118,81	94,05
112,54	119,98	95,74
113,38	120,73	97,33

114,46	122,08	98,13
115,46	157,04	100,73
116,64	158,32	102,43
118,9	159,33	103,41
119,91	160,08	104,3
120,67	161,17	105,52
122,11	216,86	108,71
123,21	217,82	110,44
127,2	219,34	111,5
137,52	220,22	112,49
144,34	222,94	113,48
154,85	225,17	114,56
157,01	230,69	115,47
158,38	231,89	116,55
159,32	232,69	118,29
160	267,01	119,88
178,28	267,49	120,71
216,91	269,01	122,05
217,79	270,37	127,11
218,35	272,93	129,9
219,32	274,29	137,44
220,2	275,09	144,24
223	277,41	147,83
225,41	278,53	154,85
230,7	279,65	157,1
231,82	281,58	158,47
232,62	282,78	159,32
254,51	283,5	160,08
266,86	285,58	169,11
267,58	287,02	178,27
268,95	290,79	179,25
270,31	292,87	180,07
274,08	296,39	182,11
275,04	298,64	217,03
275,77	304,55	217,83
277,45	308,12	218,31
278,57	308,8	219,27
279,62	310,82	220,23
280,66	312,16	222,95
281,54	314,67	224,07
283,47	315,5	225,35
285,55	316,75	226,71
286,92	370,99	230,63
287,8	372,85	231,83
290,85	450,52	232,63
292,78	456,38	243,76
294,38	458,48	244,4
296,39	461,19	254,49
298,64	464,08	264,27
301,81	466,38	265,4
304,55	467,46	267,4

307,95	469,08	268,93
308,72	469,47	270,29
310,83	471,8	274,06
312,09	472,89	275,75
314,51	473,6	277,43
316,68	474,46	278,8
354,37	477,38	279,6
370,98	478,5	280,72
372,92	480,41	281,6
407,67	489,18	283,53
450,59	495,24	284,66
451,98	496,35	285,54
452,27	497,46	286,98
456,34		290,76
458,43		292,85
460,99		293,97
464,01		296,46
466,38		298,63
467,45		301,81
469,15		303,53
470,39		304,56
471,63		307,63
472,8		308,06
473,58		308,73
474,45		309,83
476,26		310,76
477,29		312,19
478,32		314,62
480,32		315,46
483,45		316,79
487,45		317,95
487,94		319,03
489,17		320,18
496,31		321,33
497,53		322,97
		325,91
		328,91
		335,01
		337,63
		362,33
		371
		373,02
		407,54
		450,37
		452,14
		456,3
		458,48
		463,93
		466,46
		467,47
		468,39

468,93
471,66
472,75
473,54
474,41
477,26
478,29
480,29
483,44
487,36
488,1
489,01
495,01
496,13
497,34

Daumlithie:



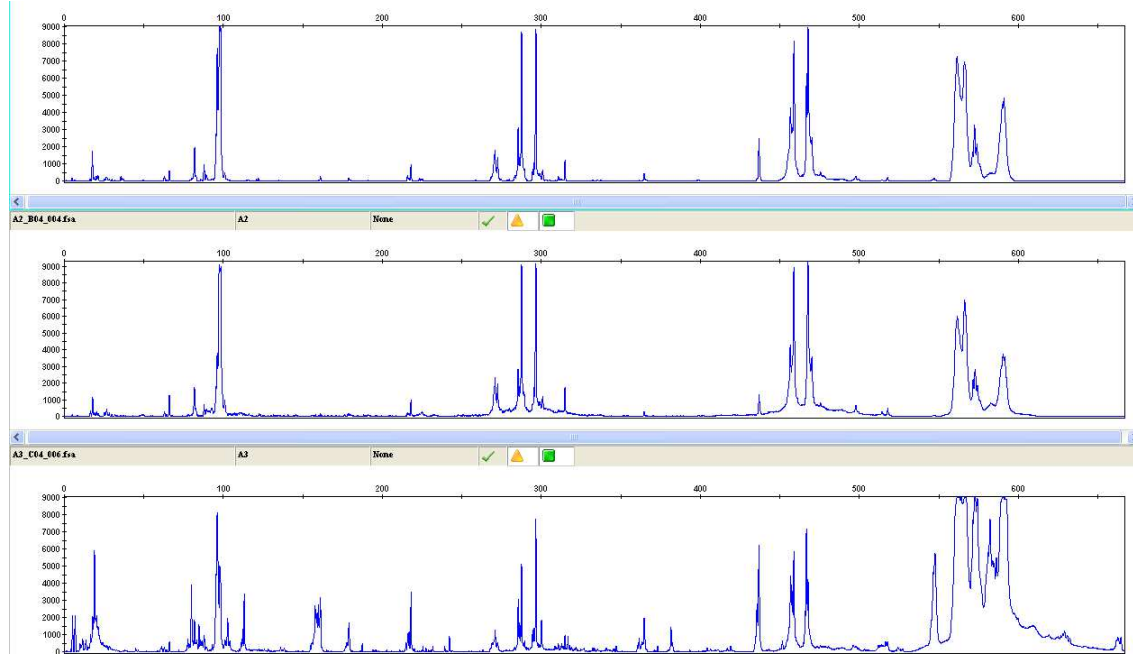
Fragmentos

D	D'	D''
62,83	54,48	62,81
64,45	66,04	66,13
66,17	80,25	67,52
67,57	82,09	76,48
76,57	84,56	80,32
78,06	92,07	82,25
78,94	94,11	84,61
80,52	95,8	87,34

81,14	97,59	88,13
82,28	98,12	89,27
84,57	100,73	90,95
87,04	102,6	92,01
88,1	115,59	94,13
89,33	118,34	97,6
91,02	119,92	100,73
92,17	120,76	102,52
92,79	122,18	103,58
94,12	123,1	112,6
95,99	124,28	113,6
97,23	126,38	114,34
98,13	157,01	115,58
98,57	157,87	117,49
99,37	159,83	118,33
100,73	160,93	119,99
101,46	161,68	120,83
102,52	163,36	122,17
103,65	220,14	123,18
110,77	231,82	124,27
111,35	232,54	125,7
113,49	266,88	126,37
114,24	269,05	132,06
115,48	269,53	157,1
118,47	270,57	157,95
119,89	272,17	159,92
120,72	274,9	161,68
122,06	276,26	163,36
123,07	277,3	179,25
124,16	280,67	220,1
125,59	281,79	231,76
126,27	282,75	232,4
141,96	283,55	233,76
143,39	284,84	235,68
145	285,64	251,03
145,57	286,76	266,8
154,94	287,89	268,96
155,8	293,58	269,44
157,01	294,78	270,48
157,79	295,83	272,24
159,75	296,71	274,89
160,93	298,56	276,17
163,28	299,2	277,29
164,95	303,27	278,18
166,21	371,12	280,5
169,12	371,64	281,62
179,53	373,06	282,67
180,1	373,58	283,55
217,44	394,67	284,75
218,16	396,68	285,55
220	419,08	286,84

222,64	451,91	287,8
229,77	456,51	288,84
230,57	457,63	293,5
231,69	458,6	294,78
232,33	463,52	296,63
233,78	463,9	299,2
234,66	466,97	300,35
235,62	467,89	312,75
249	469,28	362,24
266,89	471,93	363,78
267,78	473,74	370,9
268,98	476,82	371,49
270,59	477,22	372,91
272,19	479,7	373,51
274,04	496,37	394,72
274,92	497,51	396,66
276,13		419,04
277,33		451,62
278,3		456,37
278,86		457,64
279,98		458,62
280,47		463,62
281,43		467,93
282,63		469,17
283,52		471,82
284,72		472,53
285,61		473,79
286,73		477,04
287,78		479,68
288,74		496,28
291,23		497,41
292,28		
293,57		
294,69		
297,18		
298,31		
299,12		
300,09		
311,1		
312,28		
370,99		
371,59		
373,01		
373,61		
394,74		
395,67		
396,67		
416,91		
419,03		
449,01		
450,37		

451,69
452,28
455,63
456,52
458,62
461,34
462,1
462,48
464,01
466,93
467,86
469,49
470,26
471,98
473,79
476,25
477,28
479,77
494,4
495,71
496,37

Ardallie:

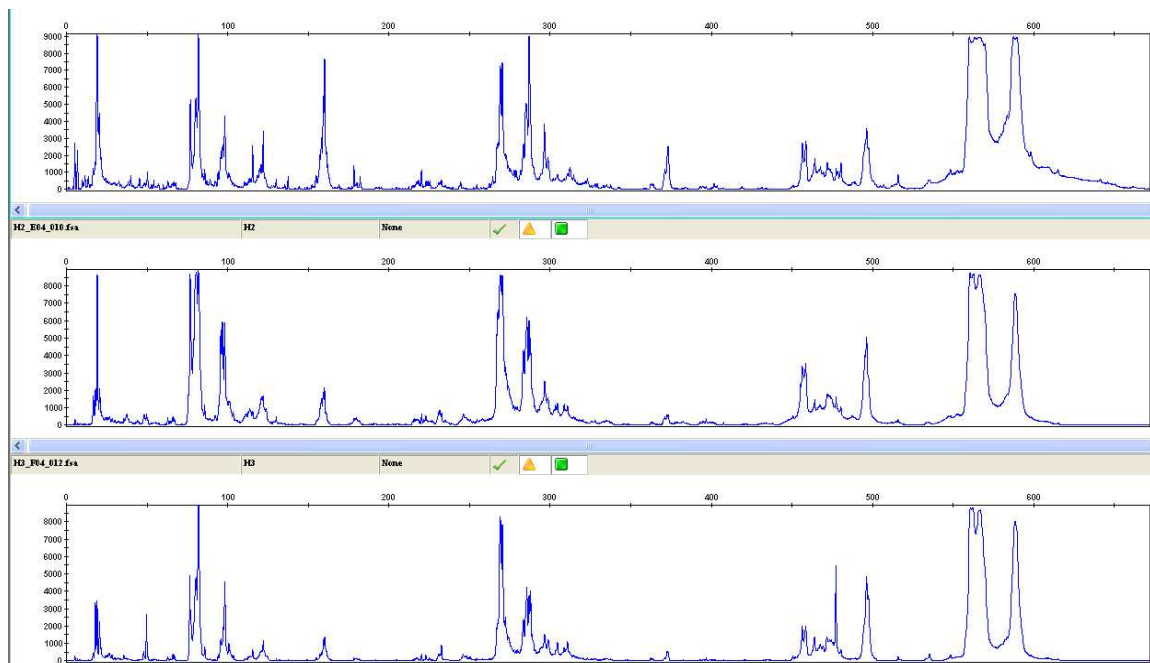
Fragmentos

A	A'	A''
62,86	62,9	60,65
66,06	66,09	61,13
81,91	81,88	62,84
82,79	82,84	66,04
87,88	87,83	77,55
89,11	89,06	78,43
89,64	89,59	79,84
95,3	90,47	80,72
96,1	92,4	81,87
97,42	93,02	82,75
98,22	94,08	83,37
100,81	95,31	84,69
161,09	96,11	85,67
215,84	97,26	86,46
217,99	98,49	87,97
268,41	100,89	89,12
270,41	107,23	89,57
270,88	109,11	92,94
272,56	110,51	95,35
283,24	111,82	96,15
284,36	215,77	97,67
285,4	216,73	101,14
286,36	218,01	102,69
287,55	224,7	103,76
289,15	225,18	104,17
294,49	268,35	111,33
295,45	270,34	112,16
296,49	270,9	113,15
298,8	272,58	135,97
300,86	274,82	138,31
310,68	276,26	154,85
314,84	277,37	155,63
364,62	278,25	157,7
436,85	279,77	158,38
456,67	281,53	159,75
457,78	282,09	161,09
458,89	282,41	176,82
463,84	283,21	177,65
465,05	285,29	178,88
466,8	286,33	187,45
467,63	287,44	214,78
470,24	289,12	215,9
473,41	291,28	216,78
474,58	292,48	217,98
474,89	293,52	225,49
475,67	294,48	227,48
477,47	295,44	231,8
497,74	296,4	239,23

298,88	242,11
300,77	268,41
301,88	269,05
302,91	270,89
304,95	272,57
307,4	283,2
308,84	285,44
309,68	286,32
310,68	287,52
312,02	289,44
313,02	290,4
313,69	291,6
314,85	293,6
315,85	294,48
317,01	295,44
318,16	296,56
364,68	297,84
436,88	298,88
442,99	300,09
444,21	308,59
444,94	309,51
446,41	310,69
446,82	312,69
447,63	313,61
448,78	314,86
449,1	315,77
449,84	316,76
450,95	317,67
451,9	318,91
453,66	321,04
456,61	321,86
457,8	332,3
458,84	333,42
463,87	340,96
464,71	347,03
467,45	360,51
467,99	361,47
470,14	363,53
473,4	364,71
475,59	373,17
476,69	381,56
477,56	382,47
479,15	404,42
480,18	416,91
482,18	419,09
483,07	434,87
485,25	435,6
486,07	436,82
487,29	450,22
488,44	451,53
489,18	454,62

490,36 456,84
 493,9 457,74
 496,03 458,86
 496,4 463,75
 497,91 464,2
 464,96
 465,96
 466,72
 467,79
 473,37
 475,57
 476,59
 477,46
 478,57
 480,65
 481,85
 486,3
 488,27
 489,01
 489,5
 496,22
 497,44
 498,29
 499,43

Hutton:



Fragmentos

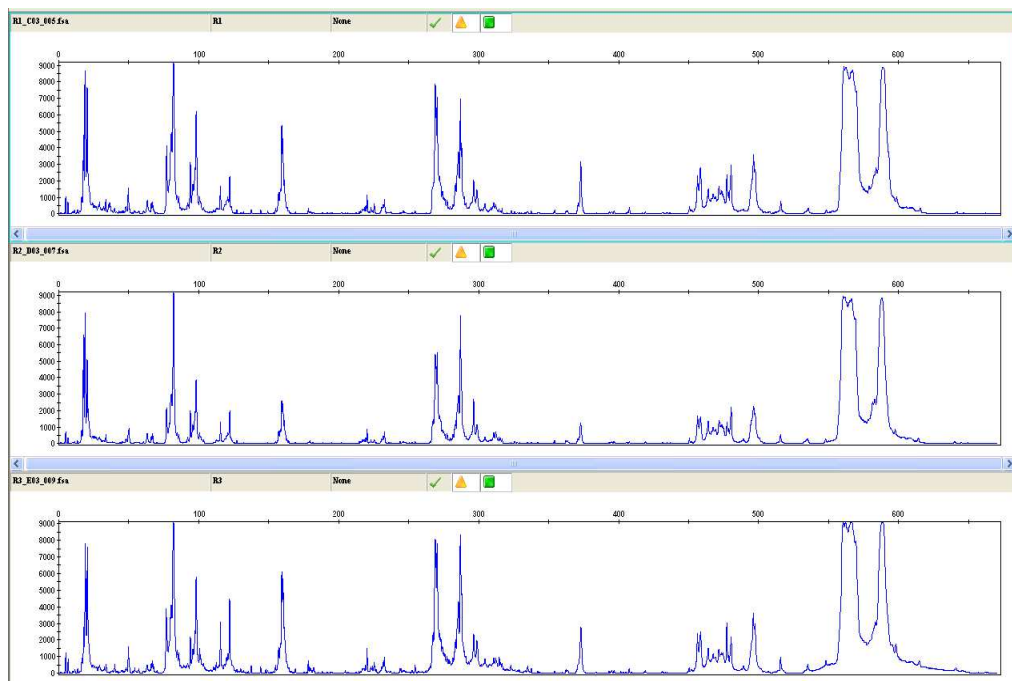
H	H'	H''
50,23	62,83	62,79
52,73	64,29	66,06
54,15	65,43	66,96
57,08	66,09	76,49
60,05	66,99	80,36
62,8	75,79	81,6
65,49	76,66	82,3
66,07	79,03	85,75
66,89	80,61	94,1
67,72	81,57	95,8
76,84	82,28	97,31
79,03	85,71	98,12
80,35	87,12	100,73
81,66	88,98	101,55
84,48	90,84	103,42
85,71	92,25	112,79
87,13	95,81	113,53
89,16	96,7	114,2
90,84	98,12	115,53
92,08	100,65	120,78
94,03	101,38	121,03
95,81	103,42	122,12
96,97	105,13	157,27
98,13	106,11	158,38
100,65	107,1	159,41
101,46	109,89	160,17
103,42	110,63	220,21
104,56	111,54	222,92
110,47	112,78	230,67
111,46	113,52	231,87
112,53	115,51	232,59
113,44	120,86	246,19
114,35	122,03	247,07
115,51	123,88	248,02
116,68	130,06	250,42
118,35	154,98	265,39
118,76	155,76	266,83
119,85	156,44	267,63
120,77	157,3	268,99
122,11	158,15	270,27
123,04	159,24	272,19
127,43	160	273,88
128,45	178,19	274,12
130,06	178,76	277,4
135,37	179,17	278,52

137,44	179,58	279,56
152,31	181,06	280,52
154,85	181,71	281,65
157,19	214,78	283,41
158,13	215,66	285,57
159,32	216,86	286,93
160,08	217,66	287,82
169,19	218,3	291,66
178,27	219,1	292,7
179,17	220,22	293,83
180,07	221,74	294,79
182,11	222,94	296,47
214,63	224,77	298,64
215,58	225,73	302,24
217,26	226,85	304,55
218,3	230,69	306,76
219,18	231,49	307,61
220,14	232,69	308,71
221,82	234,05	310,73
223,02	234,61	314,67
224,14	235,09	315,42
225,42	244,12	316,75
230,62	244,84	372,48
231,82	246,2	373
232,62	247,08	450,37
234,62	248,28	452,06
235,18	249,48	453,61
243,82	250,44	453,9
244,54	252,52	456,28
254,55	254,6	458,52
262,32	255,16	460,93
263,52	256,28	462,52
264,32	256,68	463,97
265,36	257	465,5
266,96	258,28	466,26
267,52	260,04	467,49
269,05	261,08	469,11
270,33	262,36	471,68
272,97	263,24	472,62
273,94	264,36	473,4
275,06	266,93	474,34
275,7	267,57	475,37
277,62	269,09	477,19
278,82	270,37	480,3
279,63	273,01	496,22
281,63	273,89	497,34
283,47	277,49	
285,16	278,61	
286,84	279,57	
292,78	283,42	
294,46	285,58	

296,39	286,86
298,64	287,74
301,8	292,79
303,34	293,91
303,77	294,79
304,62	296,55
307,76	298,64
308,78	300,95
310,8	302,41
312,22	303,35
314,56	304,55
315,39	306,76
316,72	308,71
317,88	309,64
318,87	310,73
320,02	314
320,68	314,67
321,75	315,67
323,14	316,75
325,5	318,07
327,78	319,06
329,07	320,13
333,17	325,85
335,16	327,96
337,55	333,02
362,35	334,38
363,82	334,86
371,17	335,81
373,18	371,13
401,7	372,48
403,48	373,15
450,59	382,47
456,36	394,98
458,53	396,75
461,17	446,56
461,92	447,54
464,13	448,03
465,43	448,52
466,35	450
467,58	450,51
469,51	455,32
470,6	456,36
471,76	458,45
472,78	461,84
473,64	463,13
474,59	464,05
477,43	465,27
478,31	466,42
480,39	467,42
481,51	469,51
483,61	471,76

485,07 472,7
 487,44 473,56
 488,02 474,5
 489,09 476,32
 490,9 477,27
 491,44 478,22
 495,29 480,3
 496,31 483,45
 497,53 485,56
 486,38
 487,36
 490,54
 490,81
 495,2
 496,22

Rathen:



Fragmentos

RT	RT'
66,19	63,11
76,75	66,17
77,63	77,53
78,94	80,41
79,64	81,89
80,52	85,66
81,84	92,1
85,71	94,13

92,08	94,93
94,12	95,73
94,92	97,24
95,72	98,13
97,23	101,37
98,12	103,8
101,38	115,89
103,73	118,53
115,86	119,45
118,51	120,61
119,43	121,35
120,59	123,1
121,35	125,19
122,26	135,92
125,2	194,52
135,9	215,59
194,47	216,63
216,76	217,66
217,72	221,72
221,95	222,76
222,82	229,92
230,01	230,64
230,65	231,44
231,93	232,63
232,57	234,94
234,96	235,9
236	237,01
236,96	247,14
247,11	249,21
249,19	254,95
254,86	255,59
255,74	256,87
256,94	266,84
257,82	267,56
266,78	269,47
267,66	270,27
269,5	272,19
270,3	273,79
272,22	275,38
274,22	277,38
275,42	278,34
277,34	280,17
278,3	280,73
280,14	282,73
280,78	283,45
283,42	285,53
285,58	286,81
286,78	287,85
287,82	288,89
288,87	289,68
289,75	290,48

290,47	292,64
291,43	293,76
292,71	294,8
293,75	295,76
294,79	296,8
295,83	298,88
296,72	299,84
297,84	303,26
298,88	304,54
299,84	307,51
301,89	308,77
303,35	310,79
304,46	311,46
306,17	312,21
306,68	362,35
307,53	363,45
308,8	430,18
310,06	449,34
310,82	450,07
311,57	451,02
335,73	451,24
362,33	451,75
363,43	452,78
430,31	454,55
451,54	456,32
452,06	457,44
454,57	458,41
456,43	461,18
457,55	462,31
458,45	463,15
461,24	464,89
462,45	465,96
463,36	467,65
464,96	468,57
466,27	469,27
467,65	471,67
469,35	472,22
471,84	472,53
472,31	473,39
472,62	475,28
473,64	476,22
475,53	478,29
477,43	480,13
478,38	488,51
480,14	494,87
495,1	496,18
496,22	497,51
497,72	

5.3. ANEXO D

5.3.1. Extracción ADN

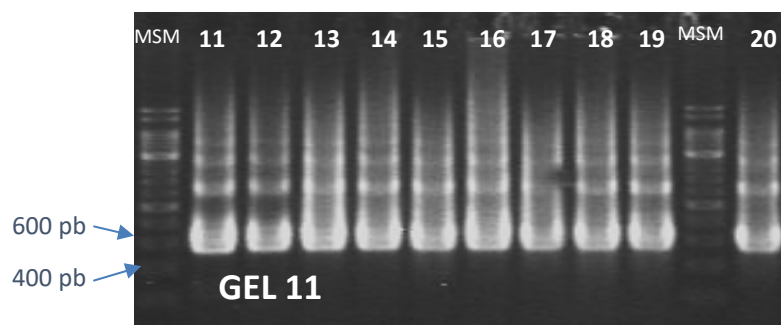
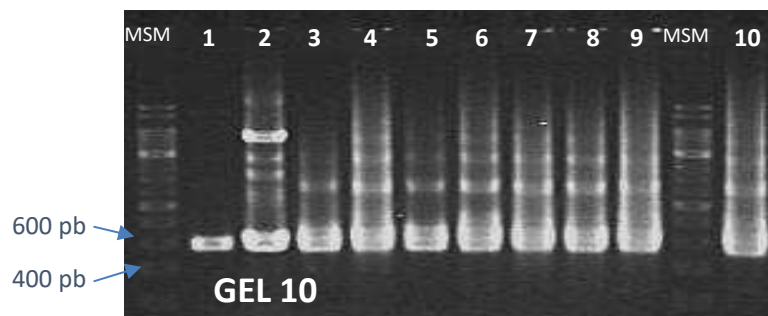
MUESTRA	REPLICAS			OBSERVACIONES
Control -				Sólo reactivos
Control +				<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35*
	1	2	3	
	4	5	6	
	7	8	9	
	10	11	12	
	13	14	15	
	16	17	18	

5.3.2. Limpieza y cuantificación ADN tras PCR

Muestra Read#	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	A2	0,057	0,048	0,037	0,018	0,009	1,949	17,65
POSITIVO	A3	0,157	0,1	0,037	0,13	0,067	1,943	130,375
1	B2	0,105	0,073	0,039	0,069	0,036	1,949	69,427
2	B3	0,149	0,096	0,039	0,12	0,062	1,92	119,755
3	C2	0,106	0,074	0,039	0,071	0,037	1,926	71,223
4	C3	0,135	0,09	0,039	0,104	0,055	1,911	104,188
5	D2	0,148	0,096	0,04	0,118	0,062	1,912	118,302
6	D3	0,141	0,094	0,042	0,108	0,057	1,904	107,907
7	E2	0,158	0,103	0,042	0,129	0,067	1,908	128,645
8	E3	0,16	0,106	0,043	0,129	0,068	1,893	128,837
9	A2	0,127	0,088	0,044	0,088	0,046	1,908	87,849
10	A3	0,104	0,073	0,038	0,069	0,036	1,925	69,333
11	B2	0,163	0,104	0,039	0,135	0,071	1,906	135,382
12	B3	0,149	0,096	0,038	0,121	0,063	1,912	120,768
13	C2	0,151	0,097	0,038	0,124	0,065	1,916	123,688
14	C3	0,154	0,1	0,041	0,124	0,065	1,909	123,944
15	D2	0,172	0,11	0,04	0,146	0,077	1,902	145,728
16	D3	0,156	0,102	0,041	0,125	0,066	1,904	125,328
17	E2	0,142	0,094	0,042	0,11	0,058	1,907	110,021
18	E3	0,147	0,096	0,039	0,119	0,062	1,903	118,917

5.3.3. Geles productos PCR

- 1: Control – PCR
 2: Control + (*B. subtilis* DNA)
 3: 1
 4: 2
 5: 3
 6: 4
 7: 5
 8: 6
 9: 7
 10: 8
 11: 9
 12: 10
 13: 11
 14: 12
 15: 13
 16: 14
 17: 15
 18: 16
 19: 17
 20: 18



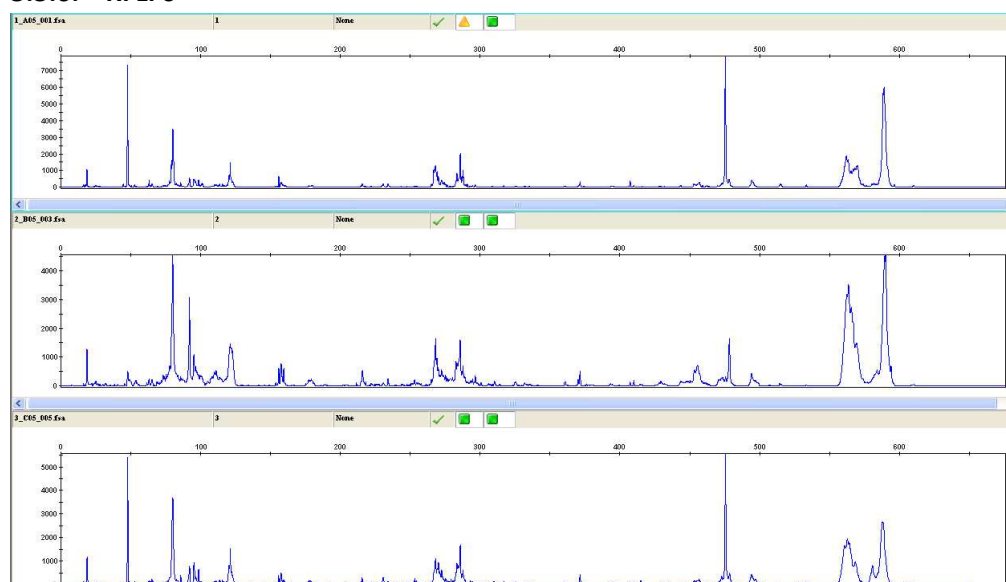
5.3.4. Limpieza y cuantificación de ADN tras digestión Mung

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	A2	0,064	0,055	0,043	0,019	0,011	1,688	18,919
POSITIVO	A3	0,087	0,067	0,042	0,046	0,025	1,862	45,809
1	B2	0,101	0,077	0,046	0,056	0,031	1,808	56,32
2	B3	0,102	0,087	0,068	0,034	0,019	1,853	34,472
3	C2	0,097	0,072	0,043	0,056	0,03	1,846	55,998
4	C3	0,086	0,066	0,041	0,046	0,025	1,84	45,75
5	D2	0,092	0,07	0,043	0,051	0,028	1,809	50,686
6	D3	0,093	0,072	0,045	0,05	0,028	1,802	49,802
7	E2	0,097	0,075	0,049	0,05	0,027	1,847	49,846
8	E3	0,099	0,074	0,043	0,059	0,032	1,828	58,637
9	F2	0,089	0,067	0,042	0,049	0,026	1,864	49,211
10	F3	0,091	0,07	0,045	0,048	0,026	1,845	48,19
11	G2	0,09	0,071	0,046	0,045	0,026	1,763	45,285
12	G3	0,078	0,063	0,043	0,035	0,019	1,826	35,114
13	H2	0,073	0,059	0,042	0,03	0,017	1,779	30,205
14	H3	0,08	0,063	0,042	0,039	0,021	1,814	38,55
15	A2	0,086	0,066	0,041	0,046	0,025	1,83	46,082
16	A3	0,09	0,068	0,04	0,051	0,028	1,857	51,307
17	B2	0,088	0,069	0,044	0,044	0,024	1,808	43,736
18	B3	0,083	0,064	0,04	0,044	0,024	1,847	43,702

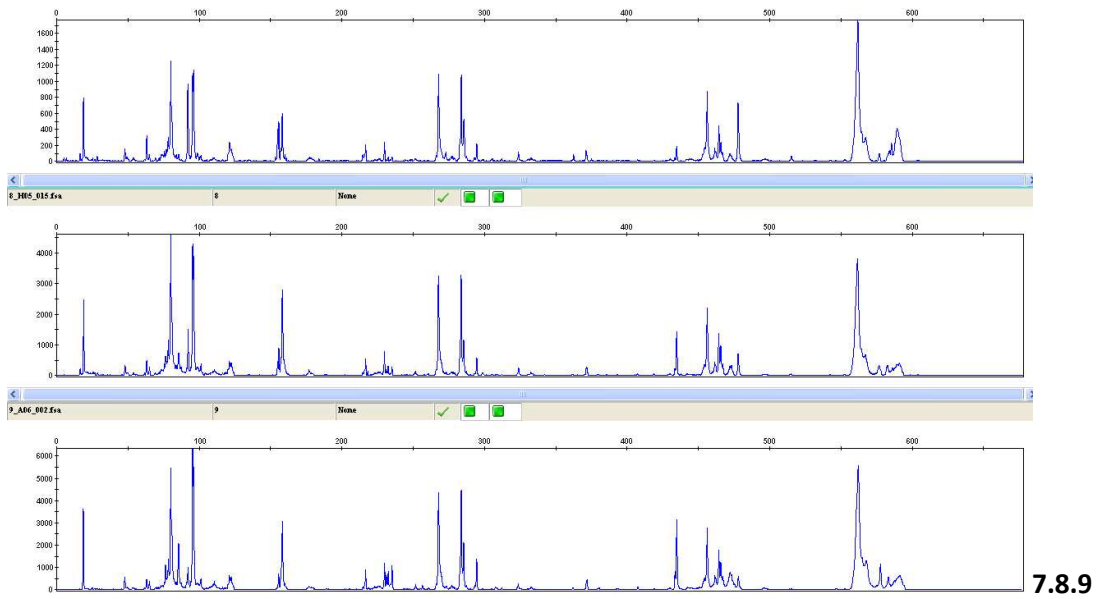
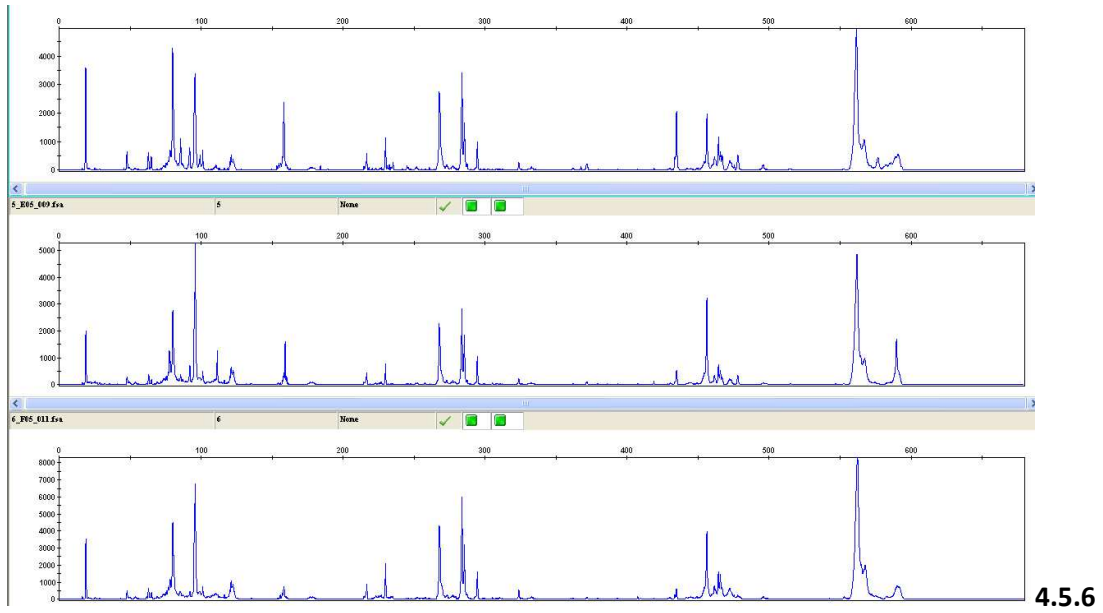
5.3.5. Limpieza y cuantificación de ADN tras digestión TaqI

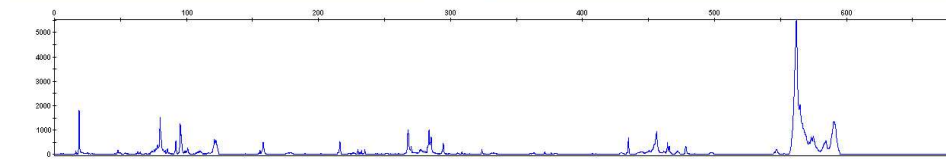
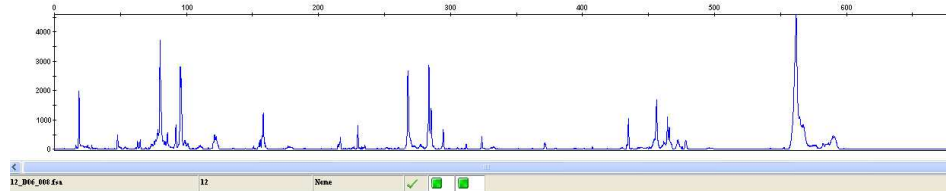
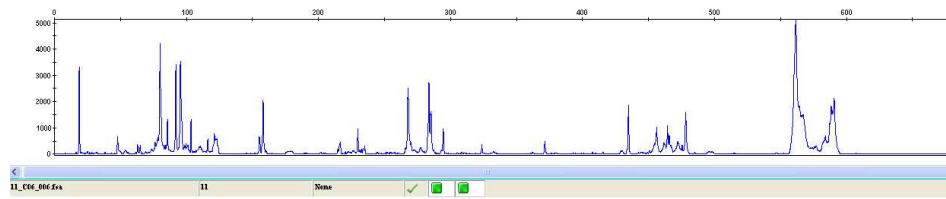
Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	A2	0,063	0,057	0,051	0,01	0,005	2,075	10,06
POSITIVO	A3	0,141	0,104	0,063	0,083	0,044	1,908	83,146
1	B2	0,114	0,085	0,054	0,063	0,033	1,913	63,258
2	B3	0,099	0,076	0,05	0,051	0,027	1,864	50,653
3	C2	0,137	0,106	0,07	0,072	0,038	1,886	72,365
4	C3	0,097	0,075	0,051	0,048	0,025	1,924	47,866
5	D2	0,103	0,079	0,051	0,055	0,029	1,891	54,737
6	D3	0,084	0,064	0,041	0,044	0,023	1,895	44,231
7	E2	0,16	0,131	0,099	0,066	0,035	1,898	65,585
8	E3	0,081	0,065	0,046	0,036	0,019	1,916	35,69
9	F2	0,09	0,069	0,047	0,045	0,023	1,932	45,266
10	F3	0,102	0,077	0,051	0,053	0,027	1,946	53,103
11	G2	0,101	0,078	0,051	0,053	0,029	1,841	52,819
12	G3	0,121	0,098	0,071	0,052	0,028	1,871	52,457
13	H2	0,105	0,083	0,057	0,051	0,027	1,852	50,52
14	H3	0,075	0,06	0,043	0,032	0,017	1,882	31,783
15	A2	0,073	0,058	0,041	0,032	0,017	1,915	32,193
16	A3	0,102	0,081	0,055	0,049	0,027	1,853	49,147
17	B2	0,106	0,087	0,061	0,047	0,026	1,789	46,517
18	B3	0,081	0,066	0,048	0,033	0,017	1,873	32,756

5.3.6. RFLPs

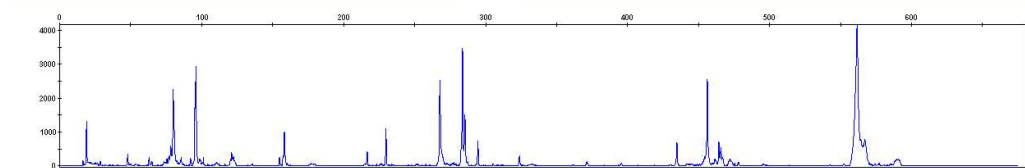
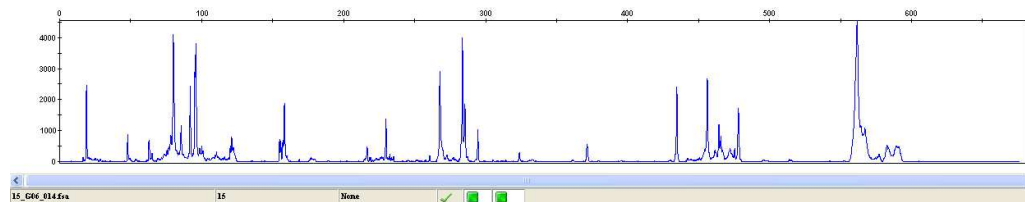
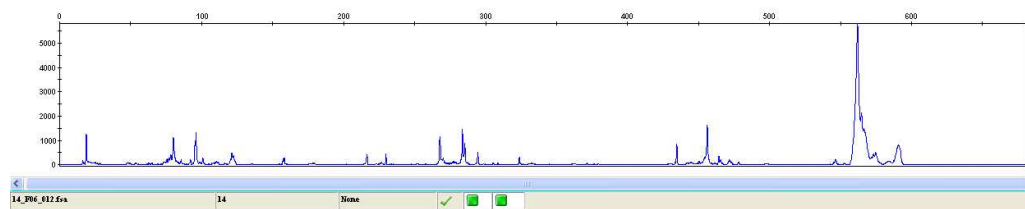


1.2.3

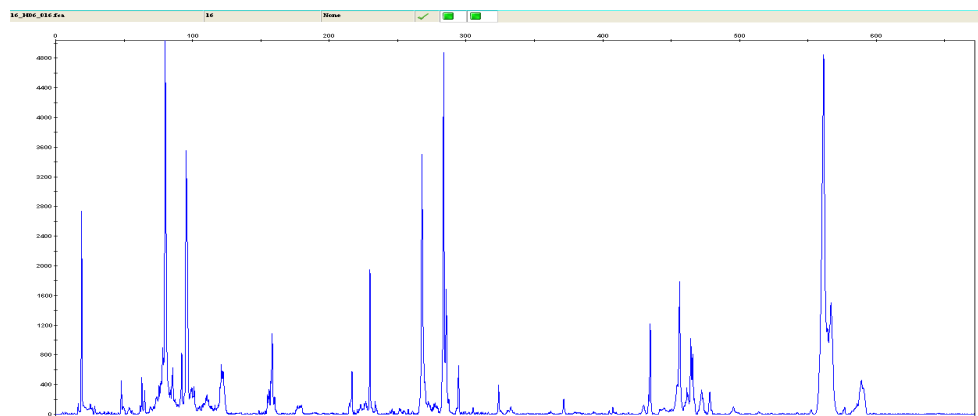




10.11.12



13.14.15



16

Fragmentos

1	2	3	4	5	6	7	8	9
63,14	63,13	65,14	62,84	63,03	62,91	63,19	63,12	63,01
65,26	65,27	77,7	64,97	73,74	65,02	78,31	65,07	64,98
77,71	73,13	80,06	75,53	74,33	73,65	79,97	75,52	75,53
79,1	74,15	82,6	76,84	75,52	74,24	92,02	76,4	76,31
80,07	75,35	85,76	78,25	77	75,52	95,38	78,24	78,33
82,61	77,82	91,93	80,01	77,7	76,92	95,91	79,99	80
85,77	80,03	95,2	82,22	80,06	78,24	121,13	83,77	83,78
92,02	82,77	96,62	83,81	83,74	80,08	154,94	85,53	85,54
95,12	83,75	98,58	85,57	85,58	83,68	155,8	87,11	87,22
95,56	85,7	115,51	86,81	86,9	85	158,21	91,1	91,11
96,45	87,3	120,32	92,05	92,1	85,44	216,67	92,16	92,08
98,58	88,01	121,15	95,26	94,14	87,21	229,91	94,11	94,12
101,22	91,13	155,84	95,88	95,38	91,19	267,76	95,36	95,28
120,38	91,94	157,63	99,28	95,91	92,07	283,71	95,98	98,04
121,21	95,15	215,56	101,14	98,13	95,36	285,48	98,21	98,66
123,06	96,59	230,63	120,29	98,84	95,9	294,59	98,66	101,14
155,89	97,31	253,19	121,13	101,22	98,66	456,19	101,21	109,75
157,27	99,64	266,79	122,48	109,64	100,32	464,35	110,58	110,57
158,04	100,66	268,05	154,8	110,46	101,22	465,74	120,19	120,31
215,76	107,16	269,24	156,11	111,45	107,18	477,82	121,11	121,15
230,48	108,4	270,19	157,24	120,26	108,08		122,45	122,5
234,17	109,89	271,21	158,28	121,18	109,72		154,94	155,63
265,09	110,97	272,48	216,68	122,52	110,38		155,81	158,3
266,78	113,47	274,05	229,92	158,21	111,79		157,36	160,08
267,58	117,32	275,4	235,14	159,24	116,35		158,22	215,97
268,22	118,07	279,11	267,78	216,67	120,2		216,67	216,69
269,1	121,1	283,37	283,64	229,91	121,04		229,84	229,95
270,14	121,95	284,39	285,41	267,68	122,47		232,41	231,22
272,31	122,71	285,81	287,51	283,63	155,81		235,14	232,58
273,43	155,85	287,7	294,6	285,4	157,27		266,03	233,7
274,24	157,5	289,12	323,77	294,59	158,3		267,72	234,18
282,74	159,4	371,52	371,76	323,74	216,65		283,69	235,14
283,38	177,48	456,71	433,65	434,86	225,91		285,38	251,84
284,99	179,3	472,83	434,81	454,33	226,8		294,51	266,07
285,79	215,69	475,51	454,48	456,13	229,94		323,87	267,75
286,91	234,05	478,52	456,21	461,45	267,76		371,75	283,75
287,72	253,15	494,39	461,53	464,3	271,39		433,49	285,35
371,58	265,17	497,13	462,22	465,69	273,41		434,73	287,43
407,29	266,79		464,38	466,86	277,37		454,4	293,2
453,04	268,16		465,69	472,12	283,67		456,14	294,56
455,87	269,13		466,93	477,96	285,45		461,38	323,68
456,7	270,1		472,35		287,3		464,31	371,84
473,1	271,07		478,01		294,58		465,7	433,66
475,48	272,36				323,77		466,95	434,8
478,28	273,97				433,63		472,13	454,26
494,4	275,27				434,79		473,24	456,19
	276,4				454,48		477,81	460,76
	277,69				456,13			461,59

278,42	459,55	462,12
280,19	460,77	464,32
281,32	461,46	465,69
282,62	464,31	466,92
283,43	465,63	470,17
285,69	466,79	472,27
286,9	472,22	473,13
287,71	475,34	475,33
289,16	477,84	478,03
294,66		
296,52		
370,09		
371,52		
453,49		
455,52		
470,97		
471,92		
472,63		
473,58		
475,57		
478,31		
494,26		

10	11	12	13	14	15	16
62,91	62,89	75,52	75,53	62,84	62,91	62,93
65,02	64,95	76,83	77,01	65,03	75,52	65,11
75,52	75,53	78,14	78,33	73,74	76,91	73,49
76,31	76,93	80,07	80,08	75,52	78,3	74,16
78,24	78,25	85,68	85,54	76,92	80,04	75,52
79,99	80,01	91,94	92,08	78,32	85,54	77
83,77	82,22	95,3	95,37	79,98	92,13	78,3
84,83	83,81	100,98	95,99	82,25	95,31	80,13
85,62	85,58	120,39	100,81	83,74	95,92	83,88
91,99	92,05	121,06	120,4	85,5	98,67	85,02
95,36	95,35	122,41	121,15	87,26	101,21	85,63
98,66	95,89	158,21	122,5	92,02	121,11	87,21
99,64	98,66	216,28	157,27	94,05	122,53	92,13
101,13	101,15	229,92	158,21	95,29	154,85	94,07
103,41	120,33	235,06	216,43	95,91	157,27	95,3
109,87	121,18	267,7	229,83	98,67	158,38	95,92
110,61	122,53	270,19	267,68	100,16	216,66	98,85
116,14	154,85	277,52	269,13	101,13	229,82	99,56
120,31	155,89	282,67	270,18	109,7	267,7	100,4

121,14	157,18	283,72	282,66	110,52	283,72	101,21
122,32	158,21	285,41	283,71	120,21	285,4	109,81
122,9	216,57	294,52	284,6	121,05	294,54	110,54
123,91	229,87	434,8	285,32	122,47	323,84	111,85
155,2	267,71	454,54	294,51	154,94	434,76	120,28
158,04	282,64	456,04	323,82	155,72	454,31	121,11
215,84	283,69	464,34	434,72	157,19	456,18	122,44
216,48	285,38	465,66	454,31	158,3	461,47	154,85
229,86	294,53	478,3	456,12	216,59	464,31	155,98
233,87	323,71		464,26	229,76	465,69	157,36
235,07	371,47		465,73	232,48	466,93	158,21
265,97	434,74		471,83	267,68		160,08
267,65	454,29			272,73		216,61
270,15	456,16			283,71		229,8
277,3	461,44			285,39		267,77
283,66	462,28			294,54		283,67
284,86	464,34			323,84		285,44
285,35	465,65			371,44		287,45
294,52	472,27			433,57		294,53
323,76	478,22			434,71		323,82
371,48				454,3		371,41
434,83				456,16		433,43
454,54				461,45		434,66
456,19				464,35		454,47
461,66				465,73		456,12
464,42				466,89		461,43
465,73				472,19		462,19
466,82				475,43		464,34
472,22				478,06		465,73
475,47						472,29
478,11						478,19

5.4. ANEXO E

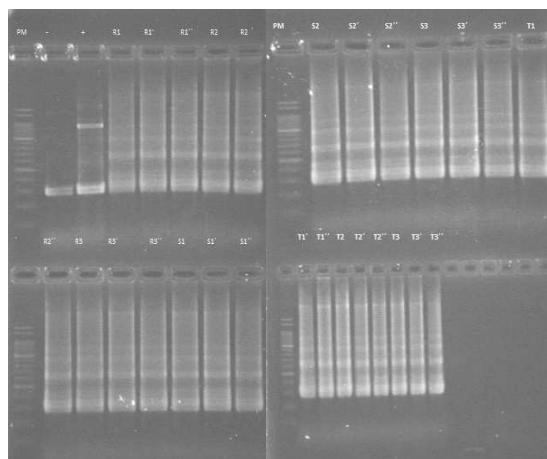
5.4.1. Extracción ADN

MUESTRA	REPLICAS			OBSERVACIONES
Control -				Sólo reactivos
Control +				<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35*
	R1.1	R1.2	R1.3	
	R2.1	R2.2	R2.3	
	R3.1	R3.2	R3.3	
	S1.1	S1.2	S1.3	
	S2.1	S2.2	S2.3	
	S3.1	S3.2	S3.3	
	T1.1	T1.2	T1.3	
	T2.1	T2.2	T2.3	
	T3.1	T3.2	T3.3	

5.4.2. Limpieza y cuantificación ADN extraído

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	A2	0,051	0,046	0,041	0,008	0,004	2,029	8,195
POSITIVO	A3	0,064	0,055	0,043	0,02	0,01	1,913	19,559
R1.1	B2	0,192	0,143	0,085	0,116	0,062	1,861	115,878
R1.2	B3	0,163	0,114	0,062	0,109	0,056	1,948	109,445
R1.3	C2	0,121	0,092	0,062	0,062	0,032	1,947	62,111
R2.1	C3	0,071	0,055	0,038	0,033	0,017	1,994	33,113
R2.2	D2	0,108	0,075	0,041	0,072	0,036	1,978	71,772
R2.3	D3	0,135	0,102	0,066	0,074	0,038	1,918	73,791
R3.1	E2	0,137	0,103	0,067	0,076	0,039	1,965	76,361
R3.2	E3	0,087	0,064	0,04	0,05	0,025	1,969	49,865
R3.3	F2	0,165	0,135	0,095	0,078	0,044	1,767	77,553
S1.1	F3	0,09	0,075	0,057	0,034	0,018	1,874	34,059
S1.2	G2	0,163	0,137	0,105	0,063	0,035	1,824	62,937
S1.3	G3	0,152	0,122	0,087	0,071	0,038	1,845	70,893
S2.1	H2	0,104	0,087	0,068	0,036	0,019	1,878	36,315
S2.2	H3	0,105	0,087	0,066	0,04	0,021	1,873	39,793
S2.3	A2	0,19	0,157	0,117	0,077	0,043	1,807	77,388
S3.1	A3	0,142	0,115	0,082	0,063	0,034	1,849	63,096
S3.2	B2	0,172	0,14	0,1	0,077	0,043	1,795	76,664
S3.3	B3	0,08	0,065	0,047	0,034	0,018	1,9	34,029
T1.1	C2	0,105	0,086	0,063	0,043	0,023	1,883	43,455
T1.2	C3	0,088	0,069	0,049	0,039	0,02	1,955	39,322
T1.3	D2	0,059	0,049	0,038	0,019	0,009	1,989	18,734
T2.1	D3	0,108	0,084	0,056	0,056	0,03	1,874	55,578
T2.2	E2	0,167	0,127	0,079	0,096	0,052	1,863	96,471
T2.3	E3	0,117	0,092	0,063	0,058	0,032	1,82	57,504
T3.1	F2	0,13	0,098	0,062	0,074	0,039	1,906	74,212
T3.2	F3	0,094	0,071	0,046	0,05	0,026	1,926	50,496
T3.3	G2	0,224	0,178	0,127	0,108	0,057	1,894	107,85

5.4.3. Geles productos PCR



5.4.4. Limpieza y cuantificación ADN tras PCR

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
NEGATIVO	A2	0,066	0,052	0,037	0,028	0,014	1,965	27,736
POSITIVO	A3	0,097	0,071	0,043	0,056	0,029	1,963	56,23
R1.1	B2	0,142	0,092	0,038	0,113	0,058	1,93	112,823
R1.2	B3	0,139	0,09	0,037	0,11	0,057	1,934	109,987
R1.3	C2	0,14	0,091	0,04	0,109	0,056	1,945	109,128
R2.1	C3	0,152	0,1	0,042	0,12	0,063	1,922	120,244
R2.2	D2	0,146	0,1	0,044	0,111	0,06	1,859	111,302
R2.3	D3	0,154	0,099	0,038	0,126	0,066	1,92	126,032
R3.1	E2	0,146	0,095	0,038	0,118	0,062	1,921	118,387
R3.2	E3	0,152	0,099	0,04	0,123	0,065	1,904	123,161
R3.3	F2	0,124	0,082	0,038	0,095	0,049	1,945	94,808
S1.1	F3	0,134	0,089	0,04	0,103	0,054	1,922	103,233
S1.2	G2	0,149	0,097	0,04	0,12	0,062	1,926	120,317
S1.3	G3	0,133	0,088	0,037	0,106	0,055	1,916	105,614
S2.1	H2	0,131	0,088	0,04	0,098	0,051	1,917	98,002
S2.2	H3	0,132	0,088	0,039	0,1	0,052	1,92	100,306
S2.3	A2	0,142	0,092	0,038	0,111	0,057	1,943	111,46
S3.1	A3	0,145	0,099	0,047	0,106	0,055	1,922	105,714
S3.2	B2	0,17	0,119	0,057	0,123	0,067	1,826	122,711
S3.3	B3	0,148	0,096	0,039	0,119	0,061	1,937	118,654
T1.1	C2	0,144	0,094	0,038	0,116	0,06	1,922	115,912
T1.2	C3	0,151	0,098	0,039	0,123	0,064	1,918	122,615
T1.3	D2	0,136	0,09	0,039	0,105	0,055	1,916	104,955
T2.1	D3	0,126	0,09	0,054	0,076	0,038	2,002	76,372
T2.2	E2	0,154	0,099	0,038	0,128	0,067	1,914	127,528
T2.3	E3	0,135	0,09	0,041	0,102	0,053	1,937	102,295
T3.1	F2	0,132	0,087	0,038	0,104	0,054	1,923	104,138
T3.2	F3	0,144	0,094	0,038	0,118	0,062	1,915	118,06
T3.3	G2	0,141	0,094	0,043	0,109	0,057	1,93	109,089

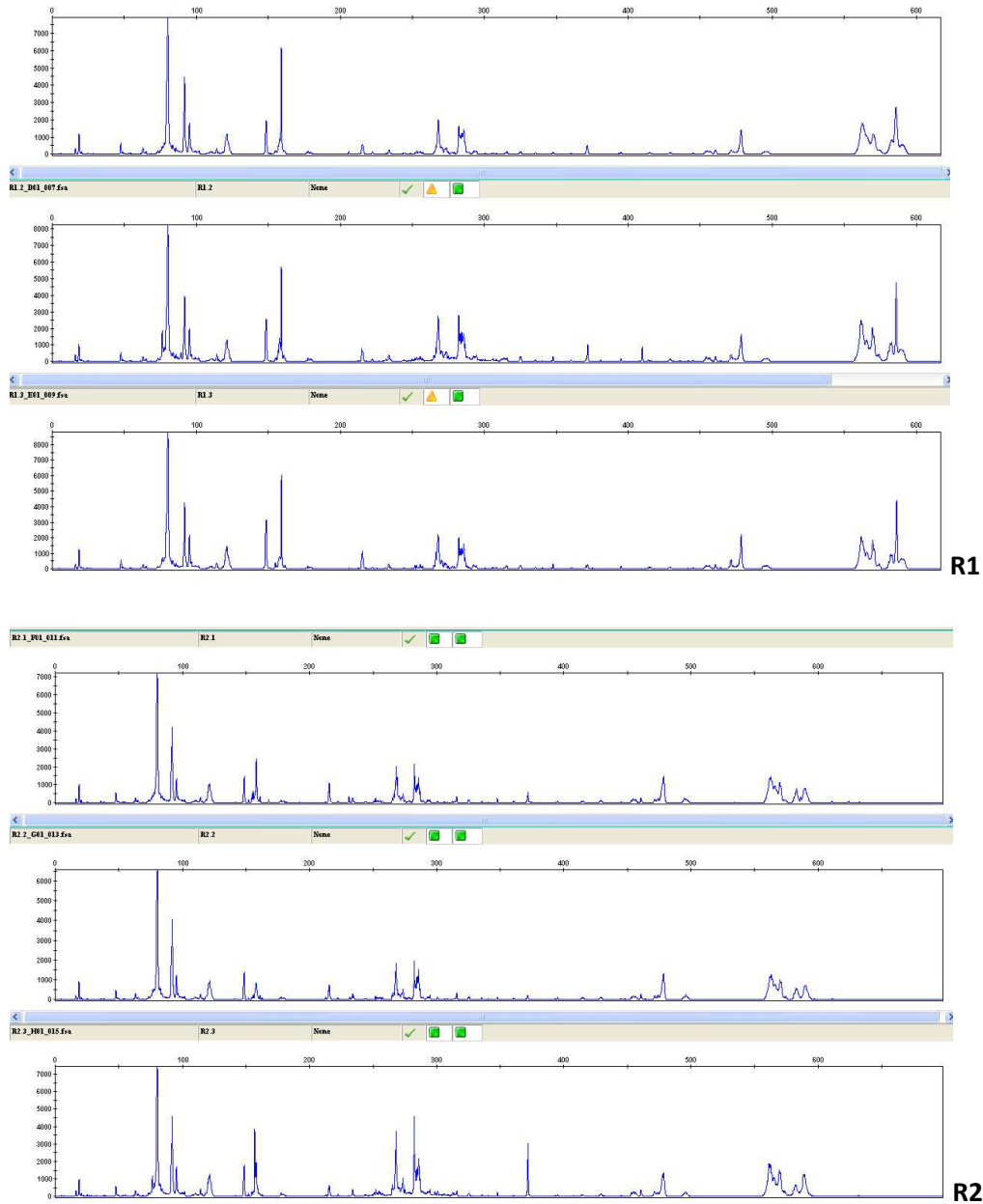
5.4.5. Limpieza y cuantificación ADN tras digestión Mung

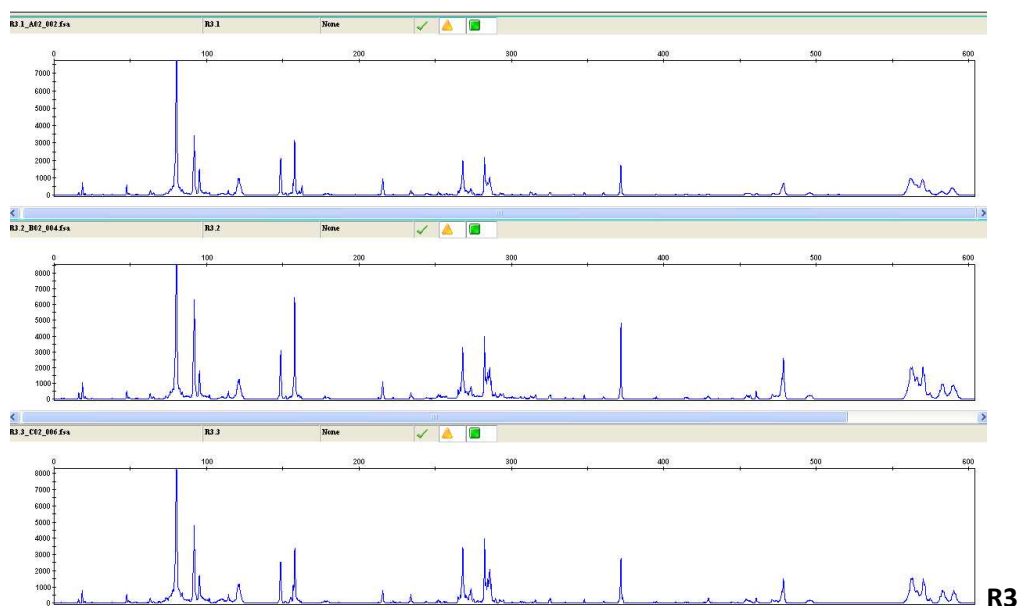
Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
NEGATIVO	A2	0,071	0,057	0,041	0,029	0,016	1,852	28,986
POSITIVO	A3	0,122	0,084	0,044	0,083	0,043	1,945	82,733
R1.1	B2	0,12	0,083	0,041	0,085	0,045	1,881	84,754
R1.2	B3	0,123	0,088	0,044	0,085	0,046	1,826	84,682
R1.3	C2	0,152	0,112	0,065	0,094	0,051	1,85	94,11
R2.1	C3	0,112	0,079	0,041	0,077	0,041	1,856	76,915
R2.2	D2	0,127	0,089	0,047	0,086	0,045	1,893	85,824
R2.3	D3	0,135	0,093	0,044	0,098	0,053	1,865	98,339
R3.1	E2	0,13	0,091	0,045	0,093	0,05	1,874	92,929
R3.2	E3	0,116	0,081	0,041	0,081	0,043	1,891	80,651
R3.3	F2	0,122	0,086	0,047	0,082	0,043	1,902	82,39
S1.1	F3	0,132	0,094	0,048	0,092	0,05	1,838	92,105
S1.2	G2	0,12	0,086	0,046	0,081	0,044	1,827	80,81
S1.3	G3	0,119	0,083	0,043	0,083	0,044	1,893	82,664
S2.1	H2	0,111	0,081	0,044	0,072	0,039	1,826	72,029
S2.2	H3	0,104	0,075	0,041	0,067	0,036	1,866	66,859

S2.3	A2	0,124	0,086	0,041	0,089	0,048	1,872	89,125
S3.1	A3	0,111	0,083	0,049	0,065	0,036	1,837	65,34
S3.2	B2	0,102	0,074	0,04	0,065	0,036	1,825	65,204
S3.3	B3	0,105	0,075	0,04	0,068	0,037	1,86	68,473
T1.1	C2	0,098	0,072	0,041	0,061	0,033	1,847	60,981
T1.2	C3	0,089	0,067	0,04	0,052	0,028	1,841	51,74
T1.3	D2	0,112	0,08	0,041	0,076	0,041	1,86	76,305
T2.1	D3	0,09	0,066	0,039	0,053	0,028	1,878	53,316
T2.2	E2	0,112	0,08	0,043	0,075	0,04	1,875	74,99
T2.3	E3	0,102	0,073	0,041	0,065	0,035	1,871	65,486
T3.1	F2	0,102	0,073	0,04	0,067	0,036	1,866	66,841
T3.2	F3	0,11	0,081	0,047	0,068	0,037	1,859	67,967
T3.3	G3	0,109	0,078	0,043	0,071	0,038	1,88	71,35

5.4.6. Limpieza y cuantificación ADN tras digestión TaqαI

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	A2	0,076	0,064	0,048	0,027	0,015	1,862	27,428
POSITIVO	A3	0,177	0,141	0,098	0,085	0,046	1,848	84,984
R1.1	B2	0,149	0,118	0,08	0,074	0,04	1,85	73,975
R1.2	B3	0,09	0,069	0,046	0,046	0,024	1,927	45,517
R1.3	C2	0,124	0,099	0,069	0,058	0,031	1,867	57,596
R2.1	C3	0,13	0,101	0,066	0,067	0,036	1,856	67,439
R2.2	D2	0,081	0,062	0,041	0,041	0,021	1,945	40,727
R2.3	D3	0,09	0,068	0,043	0,048	0,025	1,922	48,006
R3.1	E2	0,124	0,098	0,068	0,06	0,032	1,885	60,258
R3.2	E3	0,085	0,063	0,039	0,048	0,025	1,925	47,819
R3.3	F2	0,106	0,084	0,058	0,05	0,026	1,898	50,032
Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
S1.1	F3	0,108	0,086	0,06	0,051	0,027	1,896	50,733
S1.2	G2	0,12	0,093	0,063	0,061	0,032	1,903	61,455
S1.3	G3	0,097	0,074	0,048	0,051	0,027	1,909	50,786
S2.1	H2	0,110	0,086	0,059	0,053	0,027	1,951	53,208
S2.2	H3	0,153	0,119	0,081	0,077	0,041	1,902	77,086
S2.3	A2	0,126	0,101	0,071	0,057	0,031	1,851	57,274
S3.1	A3	0,128	0,1	0,067	0,064	0,035	1,866	64,45
S3.2	B2	0,104	0,078	0,048	0,059	0,031	1,901	58,694
S3.3	B3	0,093	0,066	0,038	0,057	0,029	1,949	57,449
T1.1	C2	0,157	0,124	0,085	0,078	0,042	1,839	77,948
T1.2	C3	0,084	0,067	0,047	0,038	0,02	1,918	37,861
T1.3	D2	0,112	0,088	0,062	0,052	0,028	1,881	52,4
T2.1	D3	0,104	0,084	0,06	0,045	0,024	1,899	45,065
T2.2	E2	0,09	0,068	0,043	0,049	0,026	1,901	48,832
T2.3	E3	0,099	0,075	0,048	0,054	0,028	1,922	54,091
T3.1	F2	0,086	0,063	0,039	0,05	0,026	1,932	49,571
T3.2	F3	0,115	0,093	0,065	0,053	0,03	1,797	53,032
T3.3	G2	0,088	0,07	0,047	0,043	0,024	1,829	43,123

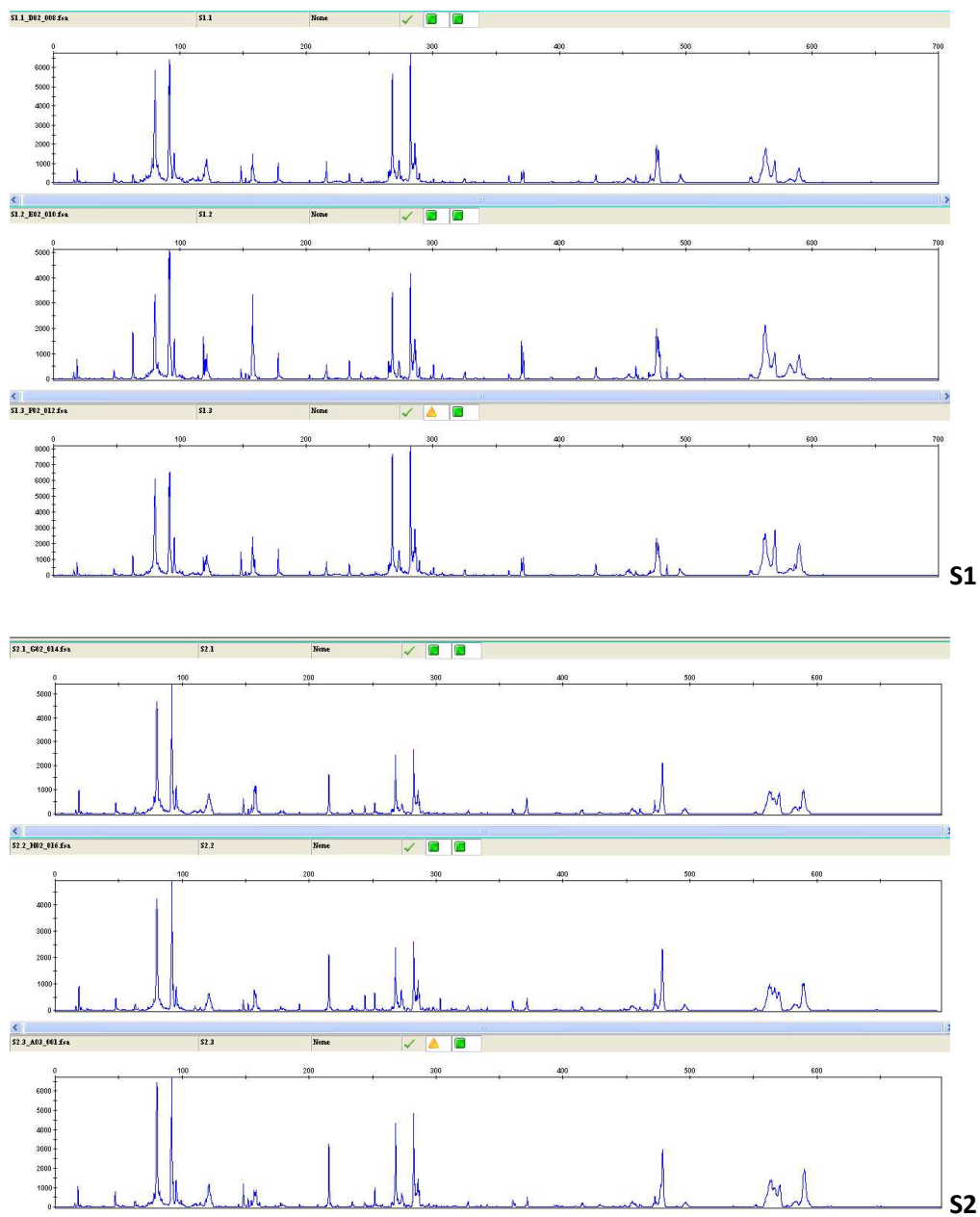
5.4.7. RFLPs

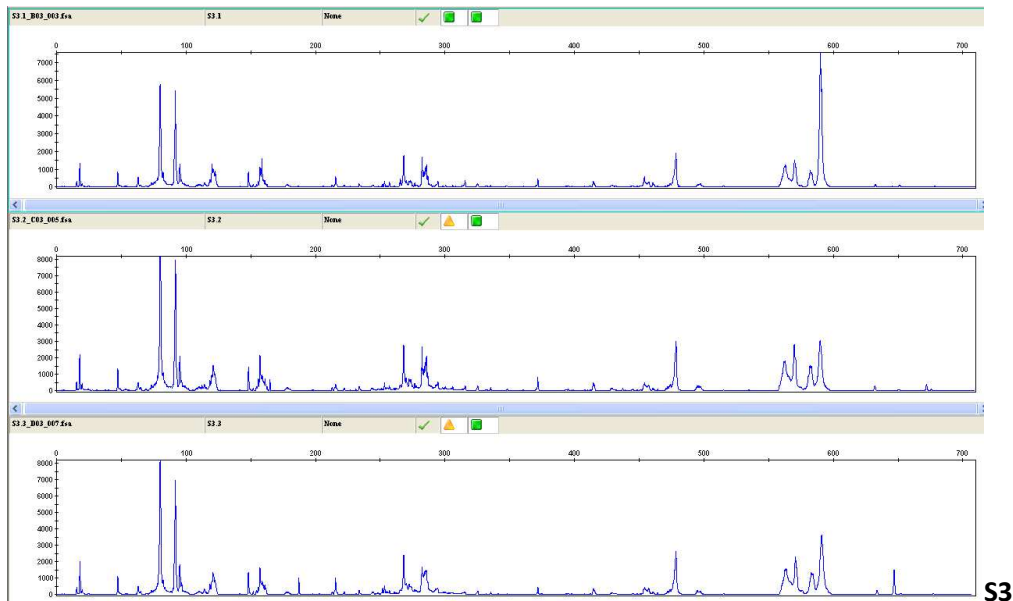


Fragmentos

R1.1	R1.2	R1.3	R2.1	R2.2	R2.3	R3.1	R3.2	R3.3
62,91	63,05	63,11	63,15	63,11	63,01	63,13	63,04	63,01
75,42	76,43	75,36	75,45	75,36	75,45	75,59	76,25	73,26
76,44	77,95	76,43	76,43	76,52	76,34	76,43	77,85	74,22
77,89	80,38	77,95	77,94	77,86	77,76	77,95	80,36	75,45
80,27	83,7	78,94	80,26	80,37	80,35	80,31	82,24	75,9
83,59	85,86	80,37	82,41	82,53	82,5	82,33	84,03	76,53
85,81	86,95	83,69	83,93	83,79	84,11	84,11	86,36	77,79
86,92	89,47	85,85	85,82	92	86,08	91,9	88,25	80,31
91,9	91,92	86,85	91,4	95,27	91,3	95,22	91,94	83,92
95,25	95,18	91,91	91,94	96,63	91,94	114,34	95,29	86,18
96,54	96,54	95,17	95,28	114,3	95,28	120,66	96,55	87,17
99,39	99,45	96,63	96,64	120,7	96,55	121,38	97,73	88,26
101,9	101,84	99,54	114,25	121,39	99,55	148,57	99,46	91,89
114,29	114,33	101,75	120,64	148,56	100,5	156,75	101,82	95,25
120,93	121,01	114,3	121,41	155,77	101,82	157,73	114,39	96,53
121,42	121,44	120,54	148,66	157,9	114,3	160,72	118,55	97,44
148,56	148,56	121,32	154,67	215,01	118,8	162,56	120,59	98,45
158,04	155,55	148,55	155,55	215,51	119,99	215,63	121,45	99,45
159,02	156,78	154,89	158,09	233,91	120,85	234,02	148,66	100,67
161,38	157,74	155,78	161,03	264,93	121,36	265	151,99	101,84
215,51	159,05	157,73	215,53	266,33	148,56	266,42	155,73	110,03
234,08	160,77	159,13	230,91	267,98	154,71	268,08	156,87	110,97
266,56	161,63	161,64	233,94	270,04	155,78	270,11	157,75	114,37
268,09	177,55	214,96	251,79	272,19	156,84	273,33	160,17	115,65
270,16	215	215,45	265,06	273,34	158,08	282,34	160,69	118,74
272,54	215,49	233,63	266,45	282,33	214,94	284,51	215,5	120,63
273,46	233,95	251,76	268,09	283,24	215,52	285,78	234,03	121,41
282,42	253,09	253	269,07	284,39	233,92	371,69	251,85	148,66
283,41	255,55	255,55	270,06	285,8	250,87	478,35	253,32	154,97

284,33	264,93	265,04	272,27	286,7	252,02	257,24	155,6
285,78	266,32	266,36	273,42	294,63	253,17	265,02	156,84
294,5	268,05	268,01	282,36	315,82	254,56	266,41	157,81
371,48	270,03	269,99	283,26	371,55	255,54	268,04	215,46
454,16	270,52	270,57	284,41	460,49	264,98	270,01	233,97
460,45	272,58	272,22	285,88	471,49	265,8	273,37	251,83
471,35	273,32	273,3	286,79	473,94	266,29	275,08	265,03
478,39	273,81	281,14	315,78	477,64	267,93	277,38	265,77
	275,04	282,3	347,73	478,39	269,98	282,29	266,34
	277,02	283,21	371,75	495,74	270,64	283,19	268,06
	277,92	284,37	454,03		273,27	284,34	270,11
	279,08	285,77	460,44		275	285,73	272,41
	282,29	288,25	474,05		277,3	286,72	273,4
	283,19	292,55	477,56		277,95	288,19	275,12
	284,35	294,62	478,39		279,02	289,5	282,34
	285,75	315,49	494,63		282,31	292,62	283,25
	286,65	325,01	495,88		284,36	293,85	284,39
	288,22	325,43			285,93	294,59	285,71
	289,53	347,71			286,67	312,46	286,69
	292,67	370,76			288,23	315,7	289,49
	293,9	371,61			289,3	324,97	292,28
	294,56	454,06			292,67	325,47	324,89
	313,55	456,54			293,66	347,8	325,48
	314,24	460,52			294,65	371,8	347,8
	315,69	471,46			298,44	428,97	371,81
	325,09	472,93			300,71	454,24	373,04
	347,73	475,64			312,63	456,61	429,34
	371,81	478,45			315,89	460,54	454,08
	409,68	494,48			347,67	471,2	460,52
	454,05	495,65			371,74	473,61	471,06
	456,52	496,82			453,05	474,26	477,46
	460,41				454,27	477,44	478,44
	471,31				455,35	478,42	
	472,77				456,66	494,72	
	477,61				460,62	495,78	
	478,52				471,02	496,95	
	496,95				471,59		
					473,94		
					477,38		
					478,29		
					495,69		





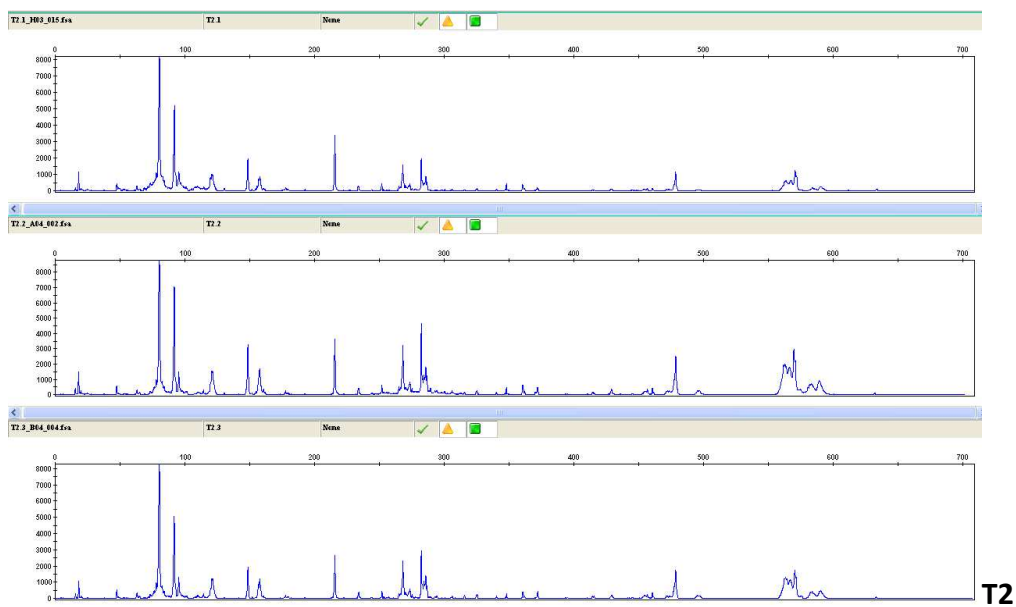
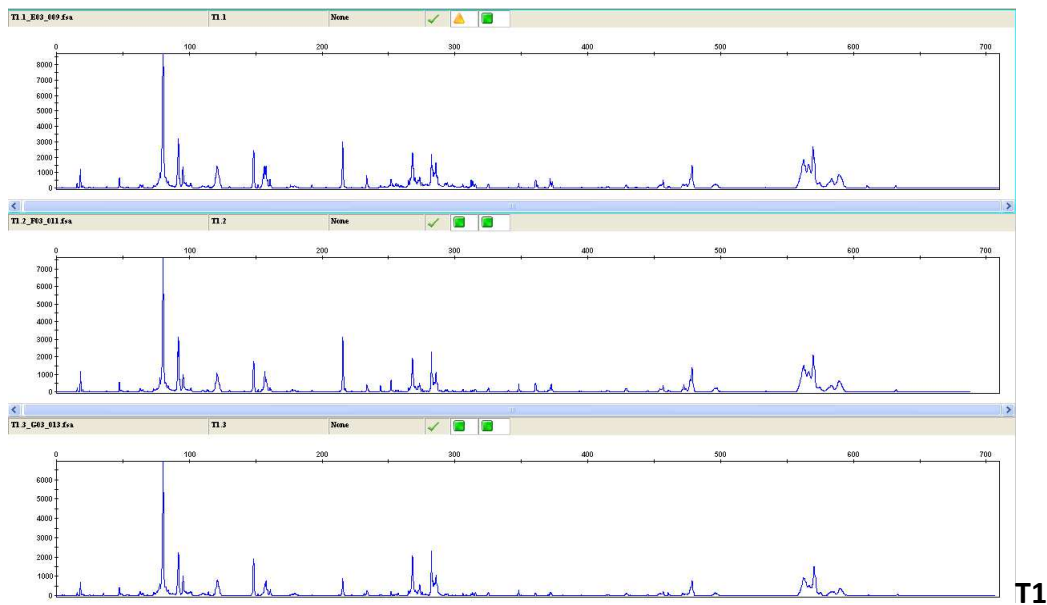
Fragmentos

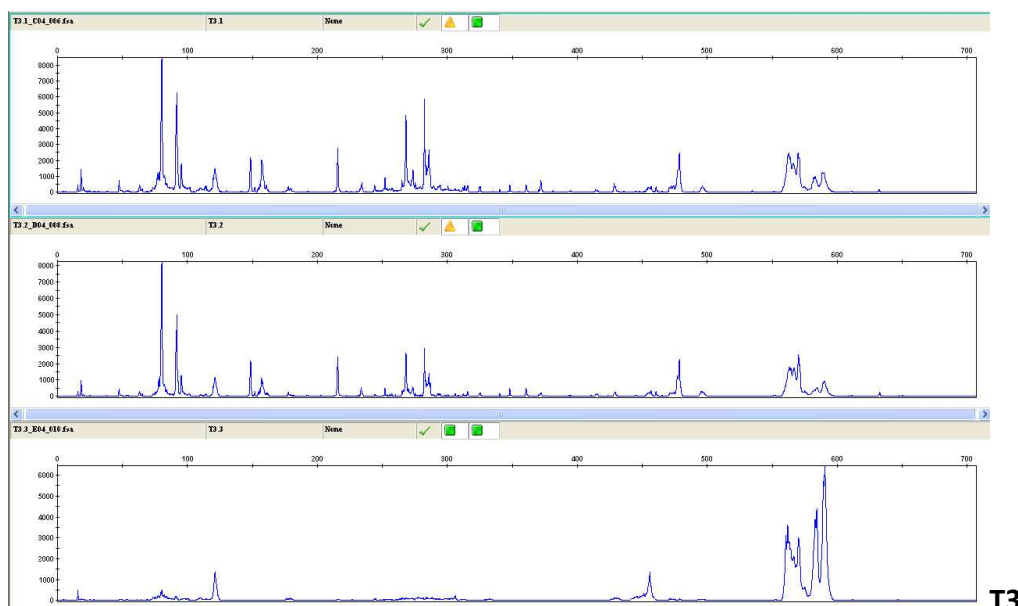
S1.1	S1.2	S1.3	S2.1	S2.2	S2.3	S3.1	S3.2	S3.3
62,76	62,67	62,72	63,12	63,04	62,64	62,98	63,01	62,97
71,64	75,27	73,35	73,45	77,76	63,15	73,42	64,9	73,26
73,27	77,05	75,36	75,36	80,17	73,34	75,27	73,33	74,39
74,39	78,57	77,06	77,14	82,23	75,27	76,26	74,38	75,27
75,36	80,18	77,96	77,94	83,75	77,07	76,98	75,36	76,61
77,05	82,6	80,38	80,26	91,3	77,97	77,97	76,36	77,96
77,85	83,94	82,54	82,5	92,02	80,23	79,95	77,99	80,03
80,36	85,56	83,89	83,84	95,28	82,3	82,39	80,08	82,45
82,51	91,22	85,78	91,22	96,73	83,75	83,48	82,45	83,62
83,94	91,86	91,29	91,94	118,76	91,18	91,81	83,72	85,52
86,18	95,56	91,92	95,28	120,54	91,81	95,17	84,63	86,06
87,17	118,5	95,54	96,55	121,14	95,26	96,45	85,45	90,03
91,22	119,87	99,91	118,72	148,08	97,54	114,22	86,73	91,75
91,85	121,24	101,92	120,86	152	99,18	118,53	87,46	95,19
95,38	148,18	114,38	148,18	156,84	114,41	120,09	88,55	96,55
98,19	151,99	118,56	152,08	157,46	118,54	120,87	91,84	97,82
99,82	157,48	120,01	154,67	158,16	119,92	122,52	93,95	98,55
101,83	177,69	121,21	155,9	192,5	121,13	148,18	95,23	99,36
109,55	215,86	148,18	157,05	215,5	148,26	155,86	96,51	109,77
110,22	233,95	152	158,01	244,02	151,92	157,1	97,89	114,02
114,37	243,04	157,55	215,54	251,71	154,53	158,6	98,62	118,39
118,46	264,93	159,04	243,7	268	155,87	160,87	99,54	119,85
120,17	266,24	177,78	251,81	270,05	156,67	215,5	110,09	120,8
121,03	267,97	178,95	265,01	272,51	158,34	253,37	111,2	122,35
148,18	270,18	202,45	265,91	273,33	160,95	257,09	112,32	148,18
151,99	272,97	215,85	268,05	282,35	215,52	265,1	114,04	154,62
156,78	282,33	233,92	270,1	284,4	217,17	265,6	118,44	155,86
157,48	284,63	254,63	272,31	285,8	234,11	268,16	119,91	157,1
177,69	285,7	264,96	272,97	286,7	243,78	269,98	120,87	158,78

215,86	286,68	266,02	282,33	303,32	251,89	272,21	122,35	160,09
233,95	289,4	267,99	284,47	360,19	264,88	273,45	148,25	160,95
243,7	300,53	269,96	285,86	371,8	265,79	276,67	154,62	161,64
264,93	307,49	273,32	286,77	472,13	268,1	282,29	155,78	187,22
266	325,53	275,13	371,36	473,35	269,93	283,2	157,11	214,75
267,97	360,14	276,36	454,11	478,24	272,91	284,2	158,78	215,49
270,1	370,09	277,92	454,57	495,69	282,35	285,02	160,09	233,78
273,3	371,78	282,35	460,6		284,25	285,68	160,95	251,91
275,11	429,09	284,56	472,11		285,74	286,68	161,65	253,39
282,33	455,41	285,71	478,31		286,66	294,54	162,69	257,17
284,47	460,52	286,7	495,88		325,38	315,52	164,85	265,63
285,78	470,81	289,41			360,53	371,79	215,53	268,18
286,68	476,99	290,88			371,85	414,62	233,71	270,15
289,4	478,22	298,44			415,52	454,06	253,39	272,28
324,86	479,55	300,61			453,45	457,62	257,03	273,35
360,14	485,23	307,49			454,6	460,44	264,98	276,56
370,09	495,88	325			472,2	474,08	265,56	277,87
370,86		325,59			473,59	475,31	268,12	282,31
371,86		360,1			476,97	476,46	270,02	283,22
429,09		370,08			478,38	478,37	272,26	284,2
454,18		371,69			496,62		273,5	285,03
455,26		428,99					275,07	285,68
460,44		453,18					276,65	286,75
472,1		453,79					277,8	293,09
473,72		454,1					280,04	294,4
476,91		455,24					281,28	325,31
478,31		456,55					282,28	371,76
495,88		460,41					283,19	414,63
		472,05					284,18	453,49
		473,58					285,01	454,1
		474,64					285,67	456,32
		476,92					286,66	457,32
		478,24					289,31	472,15
		479,39					290,97	473,85
		485,24					292,96	475,32
		495,2					293,95	478,36
							294,53	494,86
							300,35	497,31
							306,03	
							315,69	
							325,3	
							371,73	
							414,6	
							453,52	
							454,13	
							456,52	
							457,3	
							472,13	
							474	
							478,44	
							495,01	

496,08

497,44



**T3**

Fragmentos

T1.1	T1.2	T1.3	T2.1	T2.2	T2.3	T3.1	T3.2	T3.3
63,22	63,15	63,11	63,11	63,01	63,12	63,14	63,05	77,24
65	76,59	76,43	71,62	73,25	73,27	65,19	75,36	77,78
75,45	77,92	77,87	73,35	75,54	75,62	73,33	77,96	79,39
77,87	80,31	80,29	74,3	76,35	76,25	74,47	80,29	80,29
80,29	82,17	83,89	75,45	77,88	77,95	75,36	82,36	82,09
82,27	83,95	91,92	76,43	80,32	80,27	76,26	83,89	83,8
83,98	91,24	95,27	77,96	82,3	82,33	77,08	91,2	91,02
91,2	91,87	96,64	80,38	84,02	83,94	77,98	91,83	120,8
91,83	95,35	101,17	83,98	87,28	91,77	80,24	95,28	121,31
95,18	96,6	119,89	86,23	91,81	95,2	82,33	96,55	306,09
96,55	101,15	120,83	87,4	95,26	96,47	83,87	97,64	448,05
97,54	119,84	148,56	91,29	96,54	110,1	85,59	119,89	449,06
101,09	120,85	156,84	91,92	97,72	114,35	87,32	120,84	450,15
119,82	148,31	157,81	95,36	101,09	118,55	88,23	121,36	451,22
120,95	148,59	161,04	96,54	101,85	120,78	91,23	148,66	455,9
148,55	156,84	215,47	98,36	114,41	121,39	91,78	151,99	
151,82	158,04	233,59	99,54	118,61	148,66	95,24	154,84	
155,51	160,93	234,16	100,92	119,82	156,52	96,61	155,81	
156,58	215,54	251,88	107,3	120,86	157,74	97,53	156,96	
157,81	233,59	264,99	107,8	121,37	177,66	98,44	157,92	
160,78	243,91	266,48	109,58	147,22	215,61	99,45	160,78	
215,47	251,9	268,13	111,02	148,66	234,19	100,84	161,72	
233,52	264,98	270,11	114,5	154,76	251,96	101,85	177,6	
251,83	266,44	272,58	119,8	157,74	264,97	109,66	215,55	
253,16	268,13	273,41	120,66	159,83	265,96	110,17	233,59	
255,65	270,07	275,14	121,44	160,69	266,45	113,42	251,96	
257,06	272,34	282,32	148,56	177,64	268,18	114,37	264,99	

264,94	273,47	284,3	155,6	215,55	270,07	118,5	265,9
266,43	275,16	285,87	156,75	234,05	273,45	119,8	266,39
267,51	282,28	286,7	157,9	251,91	275,18	120,76	268,13
268,09	283,01	348,06	177,72	264,93	282,35	121,36	270,02
269,92	284,22	456,74	215,56	265,91	283,18	148,55	272,75
271,08	285,84	478,57	233,6	266,4	284,33	151,82	273,49
272,24	286,65		251,82	268,12	285,81	154,71	275,22
273,4	325,39		264,95	270,01	286,64	155,78	282,32
275,15	348,03		266,43	273,45	315,72	157,02	283,07
276,06	360,64		267,42	275,17	324,78	160,78	284,3
277,14	371,96		268,08	277,38	325,46	177,59	285,79
277,97	372,57		270,07	277,95	348,08	179,2	286,7
279,05	429,02		271,22	279,18	360,55	179,54	315,59
280,05	456,68		272,3	280,17	372,12	215,56	325,43
282,29	472,32		273,45	282,3	454,58	232,77	348
283,04	477,11		282,3	284,26	456,66	234,17	360,48
284,37	478,56		284,45	285,82	460,55	243,97	371,76
285,7	496		285,85	286,64	478,49	251,05	429,12
286,7	497,23		286,68	288,28	495,25	251,96	454,52
288,19			348	289,43		253,44	455,45
292,1			360,48	292,7		255,99	456,69
292,85			478,42	294,34		257,15	460,52
294,26				300,43		264,97	472,2
298				306,06		265,8	473,26
306,04				324,72		266,46	473,99
312,21				325,39		268,1	477,13
313,24				348,01		270,08	478,45
314,02				360,55		273,46	495,45
315,48				362		275,19	496,04
325,3				372,04		276,18	
348,05				428,99		277,83	
360,89				454,33		279,23	
362,13				455,47		280,05	
371,63				456,62		282,28	
372,57				460,57		283,18	
373,43				471,63		284,26	
454,64				472,19		285,82	
455,65				473,64		286,65	
456,75				475,75		288,21	
471,95				478,53		289,45	
474,09				495,25		293,07	
475,91				496,02		294,39	
476,99				496,88		298,19	
478,58						300,44	
496,14						306,08	
497,51						311,93	
						313,22	
						315,61	
						324,76	
						325,26	
						348,06	

360,49
371,91
428,27
429,2
454,66
455,5
456,74
460,63
470,87
472,16
474,03
477,55
478,54
495,3
496,08
497,34

5.5. ANEXO F

5.5.1. Extracción ADN

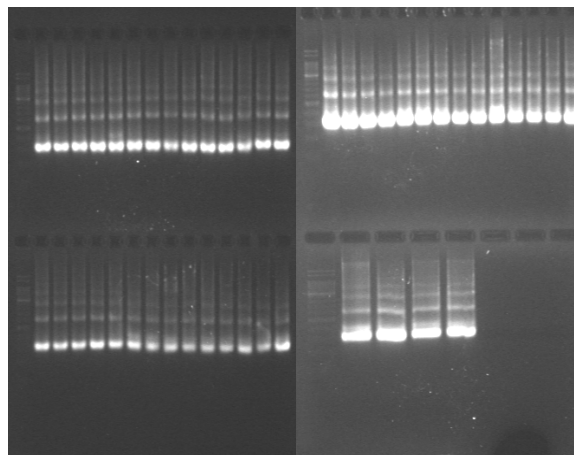
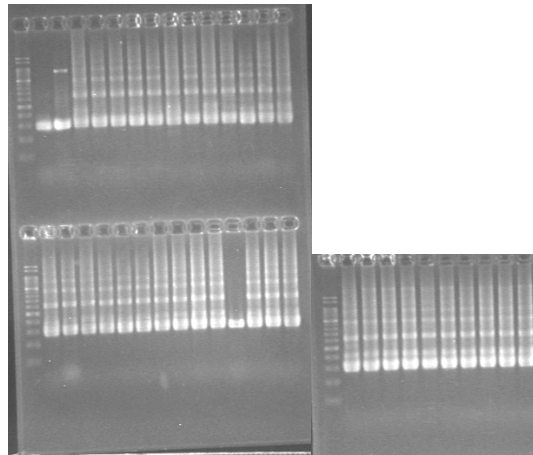
MUESTRA	REPLICAS			OBSERVATIONS
Control -				Sólo reactivos
Control +				<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35*
A Coruña	1.1.1	1.1.2	1.1.3	
	1.2.1	1.2.2	1.2.3	
	1.3.1	1.3.2	1.3.3	
Oviedo (Asturias)	2.1.1	2.1.2	2.1.3	
	2.2.1	2.2.2	2.2.3	
	2.3.1	2.3.2	2.3.3	
Barcelona	3.1.1	3.1.2	3.1.3	
	3.2.1	3.2.2	3.2.3	
	3.3.1	3.3.2	3.3.3	
Riolobos (Cáceres)	4.1.1	4.1.2	4.1.3	
	4.2.1	4.2.2	4.2.3	
	4.3.1	4.3.2	4.3.3	
Alcalá de Henares	5.1.1	5.1.2	5.1.3	
	5.2.1	5.2.2	5.2.3	
	5.3.1	5.3.2	5.3.3	
Valencia	6.1.1	6.1.2	6.1.3	
	6.2.1	6.2.2	6.2.3	
	6.3.1	6.3.2	6.3.3	
Huelva	7.1.1	7.1.2	7.1.3	
	7.2.1	7.2.2	7.2.3	
	7.3.1	7.3.2	7.3.3	
Granada	8.1.1	8.1.2	8.1.3	
	8.2.1	8.2.2	8.2.3	
	8.3.1	8.3.2	8.3.3	
Almeria	9.1.1	9.1.2	9.1.3	
	9.2.1	9.2.2	9.2.3	
	9.3.1	9.3.2	9.3.3	

5.5.2. Limpieza y cuantificación ADN extraído

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
1.1.1	A2	0,098	0,085	0,067	0,03	0,018	1,718	30,111
1.1.2	A3	0,186	0,161	0,125	0,063	0,038	1,674	63,44
1.1.3	B2	0,136	0,117	0,092	0,046	0,026	1,788	45,772
1.2.1	B3	0,065	0,056	0,046	0,016	0,009	1,881	16,476
1.2.2	C2	0,047	0,042	0,038	0,006	0,003	2,029	5,922
1.2.3	C3	0,081	0,07	0,056	0,024	0,014	1,798	24,314
1.3.1	D2	0,117	0,101	0,08	0,038	0,021	1,789	37,667
1.3.2	D3	0,088	0,077	0,061	0,027	0,015	1,765	26,513
1.3.3	E2	0,072	0,063	0,052	0,018	0,009	1,948	18,21
2.1.1	C2	0,082	0,068	0,052	0,03	0,016	1,918	29,893
2.1.2	C3	0,09	0,071	0,05	0,041	0,021	1,966	41,022
2.1.3	D2	0,059	0,05	0,039	0,018	0,009	1,937	18,241
2.2.1	D3	0,173	0,143	0,104	0,074	0,041	1,794	74,024
2.2.2	E2	0,203	0,163	0,114	0,097	0,053	1,819	96,821
2.2.3	E3	0,107	0,086	0,061	0,048	0,026	1,85	48,047
2.3.1	F2	0,167	0,143	0,109	0,063	0,037	1,708	62,932
2.3.2	F3	0,163	0,14	0,108	0,059	0,034	1,716	58,549
2.3.3	G2	0,149	0,13	0,101	0,051	0,03	1,674	50,799
3.1.1	E3	0,163	0,141	0,111	0,054	0,031	1,732	54,091
3.1.2	F2	0,136	0,113	0,086	0,053	0,029	1,858	53,026
3.1.3	F3	0,15	0,133	0,107	0,045	0,027	1,698	45,445
3.2.1	G2	0,107	0,097	0,084	0,021	0,011	1,847	21,125
3.2.2	G3	0,096	0,085	0,07	0,026	0,015	1,727	26,214
3.2.3	H2	0,074	0,069	0,059	0,013	0,008	1,515	12,814
3.3.1	H3	0,07	0,064	0,056	0,013	0,007	1,718	12,508
3.3.2	A2	0,095	0,084	0,068	0,026	0,015	1,767	25,64
3.3.3	A3	0,088	0,079	0,066	0,02	0,012	1,73	20,352
4.1.1	B2	0,135	0,115	0,089	0,048	0,026	1,823	47,683
4.1.2	B3	0,163	0,136	0,103	0,063	0,034	1,847	62,964
4.1.3	C2	0,135	0,114	0,089	0,048	0,026	1,884	48,324
4.2.1	C3	0,165	0,139	0,105	0,064	0,036	1,8	64,391
4.2.2	D2	0,101	0,085	0,066	0,034	0,019	1,825	34,494
4.2.3	D3	0,06	0,052	0,043	0,015	0,008	1,83	14,954
4.3.1	E2	0,085	0,072	0,058	0,027	0,014	1,908	26,78
4.3.2	E3	0,133	0,114	0,089	0,046	0,026	1,753	45,539
4.3.3	F2	0,185	0,155	0,116	0,075	0,042	1,779	75,371
5.1.1	A2	0,122	0,099	0,07	0,054	0,03	1,803	54,102
5.1.2	A3	0,073	0,058	0,042	0,031	0,016	1,898	30,745
5.1.3	B2	0,128	0,1	0,067	0,064	0,034	1,892	64,494
5.2.1	B3	0,096	0,076	0,052	0,044	0,024	1,877	44,237
5.2.2	C2	0,109	0,088	0,062	0,048	0,026	1,82	47,829
5.2.3	C3	0,117	0,096	0,07	0,05	0,027	1,804	49,56
5.3.1	D2	0,1	0,084	0,064	0,036	0,02	1,827	35,698
5.3.2	D3	0,119	0,101	0,077	0,043	0,023	1,824	42,624
5.3.3	E2	0,115	0,098	0,075	0,041	0,023	1,771	41,362

6.1.1	E3	0,075	0,066	0,054	0,019	0,01	1,819	18,998
6.1.2	F2	0,098	0,085	0,068	0,029	0,016	1,775	29,136
6.1.3	F3	0,138	0,117	0,088	0,052	0,029	1,785	52,039
6.2.1	G2	0,081	0,071	0,058	0,021	0,011	1,862	21,067
6.2.2	G3	0,078	0,07	0,059	0,017	0,009	1,829	16,8
6.2.3	H2	0,053	0,048	0,042	0,009	0,005	1,93	8,728
6.3.1	H3	0,182	0,153	0,114	0,073	0,041	1,766	73,245
6.3.2	A2	0,075	0,068	0,057	0,016	0,01	1,635	16,099
6.3.3	A3	0,093	0,08	0,065	0,028	0,015	1,858	27,603
7.1.1	B2	0,064	0,058	0,05	0,011	0,006	1,872	11,347
7.1.2	B3	0,186	0,156	0,116	0,074	0,041	1,786	74,066
7.1.3	C2	0,096	0,084	0,068	0,028	0,016	1,774	27,516
7.2.1	C3	0,163	0,139	0,107	0,061	0,035	1,745	60,506
7.2.2	D2	0,13	0,113	0,092	0,038	0,021	1,804	38,305
7.2.3	D3	0,127	0,11	0,088	0,039	0,022	1,805	39,48
7.3.1	E2	0,096	0,084	0,068	0,028	0,016	1,753	27,622
7.3.2	E3	0,083	0,075	0,062	0,019	0,011	1,709	19,399
7.3.3	F2	0,091	0,08	0,066	0,025	0,013	1,848	24,721
8.1.1	F3	0,079	0,061	0,041	0,04	0,02	1,948	39,583
8.1.2	G2	0,095	0,08	0,06	0,036	0,02	1,788	36,019
8.1.3	G3	0,1	0,081	0,059	0,043	0,023	1,898	42,9
8.2.1	H2	0,149	0,123	0,09	0,062	0,035	1,8	62,429
8.2.2	H3	0,062	0,051	0,039	0,022	0,011	1,947	21,83
8.2.3	A2	0,196	0,16	0,115	0,086	0,048	1,786	86,002
8.3.1	A3	0,165	0,134	0,095	0,074	0,041	1,808	73,747
8.3.2	B2	0,128	0,087	0,044	0,091	0,046	1,975	90,69
8.3.3	B3	0,069	0,053	0,037	0,031	0,016	1,998	30,997
9.1.1	F3	0,09	0,071	0,05	0,041	0,022	1,866	41,264
9.1.2	G2	0,141	0,122	0,096	0,047	0,026	1,787	47,278
9.1.3	G3	0,056	0,051	0,044	0,008	0,004	1,876	8,229
9.2.1	H2	0,058	0,052	0,043	0,013	0,007	1,799	12,884
9.2.2	H3	0,058	0,051	0,042	0,014	0,007	1,881	13,814
9.2.3	A2	0,085	0,067	0,047	0,038	0,019	1,933	37,67
9.3.1	A3	0,08	0,071	0,059	0,02	0,011	1,8	20,026
9.3.2	B2	0,071	0,061	0,049	0,02	0,012	1,761	20,449
9.3.3	B3	0,068	0,058	0,045	0,021	0,011	1,823	20,599

5.5.3. Geles PCR



5.5.4. Limpieza y cuantificación ADN productos PCR

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
NEGATIVO	C2	0,08	0,06	0,041	0,04	0,02	2,001	40,14
POSITIVO	C3	0,16	0,101	0,038	0,134	0,069	1,942	134,003
NEGATIVO	A2	0,076	0,058	0,037	0,039	0,02	1,939	38,914
POSITIVO	A3	0,112	0,076	0,038	0,079	0,04	1,945	78,672
1.1.1	A2	0,245	0,148	0,044	0,22	0,114	1,934	220,322
1.1.2	A3	0,172	0,108	0,039	0,145	0,074	1,949	145,085
1.1.3	B2	0,216	0,136	0,048	0,184	0,096	1,925	184,382
1.2.1	B3	0,199	0,121	0,038	0,177	0,091	1,947	176,722
1.2.2	C2	0,177	0,11	0,04	0,151	0,077	1,948	150,95
1.2.3	C3	0,204	0,126	0,041	0,18	0,093	1,929	179,95
1.3.1	D2	0,189	0,125	0,054	0,149	0,078	1,913	148,572
1.3.2	D3	0,204	0,126	0,042	0,18	0,093	1,933	179,638

1.3.3	E2	0,25	0,158	0,058	0,216	0,112	1,919	215,608
2.1.1	B2	0,152	0,097	0,038	0,124	0,064	1,952	124,059
2.1.2	B3	0,146	0,095	0,04	0,115	0,059	1,941	114,602
2.1.3	C2	0,145	0,094	0,037	0,118	0,061	1,931	117,608
2.2.1	C3	0,162	0,102	0,038	0,136	0,07	1,94	136,162
2.2.2	D2	0,188	0,134	0,067	0,133	0,074	1,803	132,72
2.2.3	D3	0,142	0,092	0,038	0,113	0,058	1,948	113,363
2.3.1	E2	0,142	0,095	0,042	0,11	0,057	1,926	110,389
2.3.2	E3	0,135	0,089	0,04	0,104	0,054	1,945	104,119
2.3.3	F2	0,161	0,102	0,039	0,136	0,07	1,938	136,043
3.1.1	E3	0,164	0,106	0,04	0,136	0,071	1,911	136,333
3.1.2	F2	0,187	0,123	0,051	0,152	0,08	1,905	151,693
3.1.3	F3	0,181	0,113	0,038	0,157	0,082	1,916	156,787
3.2.1	G2	0,201	0,134	0,061	0,156	0,08	1,94	155,706
3.2.2	G3	0,146	0,096	0,043	0,113	0,058	1,934	113,029
3.2.3	H2	0,227	0,148	0,062	0,182	0,096	1,907	182,188
3.3.1	H3	0,169	0,108	0,042	0,138	0,072	1,915	138,14
3.3.2	A2	0,174	0,118	0,057	0,127	0,066	1,926	127,319
3.3.3	A3	0,144	0,093	0,038	0,114	0,059	1,937	113,779
4.1.1	B2	0,217	0,138	0,052	0,18	0,094	1,927	180,225
4.1.2	B3	0,215	0,146	0,07	0,159	0,083	1,908	159,05
4.1.3	C2	0,163	0,104	0,04	0,134	0,069	1,932	134,215
4.2.1	C3	0,131	0,096	0,056	0,081	0,043	1,887	80,831
4.2.2	D2	0,102	0,073	0,039	0,067	0,035	1,91	66,976
4.2.3	D3	0,198	0,128	0,052	0,161	0,084	1,912	160,747
4.3.1	E2	0,178	0,117	0,049	0,143	0,075	1,918	143,167
4.3.2	E3	0,193	0,128	0,056	0,152	0,079	1,928	151,539
4.3.3	F2	0,191	0,12	0,043	0,166	0,086	1,937	166,321
5.1.1	F3	0,152	0,1	0,042	0,122	0,064	1,915	122,083
5.1.2	G2	0,156	0,102	0,043	0,124	0,065	1,927	124,441
5.1.3	G3	0,159	0,102	0,04	0,131	0,069	1,917	131,329
5.2.1	H2	0,152	0,099	0,04	0,122	0,063	1,93	121,85
5.2.2	H3	0,15	0,097	0,039	0,12	0,063	1,918	120,297
5.2.3	A2	0,172	0,107	0,038	0,146	0,074	1,964	145,889
5.3.1	A3	0,157	0,099	0,038	0,13	0,066	1,966	129,839
5.3.2	B2	0,148	0,096	0,04	0,117	0,06	1,946	117,317
5.3.3	B3	0,16	0,103	0,042	0,128	0,066	1,95	128,11
6.1.1	C2	0,144	0,093	0,037	0,116	0,06	1,945	116,477
6.1.2	C3	0,146	0,095	0,041	0,114	0,059	1,935	114,148
6.1.3	D2	0,155	0,102	0,043	0,122	0,063	1,932	122,068
6.2.1	D3	0,148	0,095	0,037	0,121	0,062	1,938	120,715
6.2.2	E2	0,151	0,098	0,042	0,12	0,062	1,932	119,987
6.2.3	E3	0,148	0,096	0,04	0,118	0,061	1,929	118,486
6.3.1	F2	0,144	0,094	0,039	0,117	0,061	1,926	116,577
6.3.2	F3	0,153	0,1	0,042	0,123	0,064	1,918	123,118
6.3.3	G2	0,143	0,096	0,044	0,109	0,057	1,908	109,432
7.1.1	G3	0,143	0,094	0,041	0,112	0,058	1,935	112,471
7.1.2	H2	0,138	0,091	0,04	0,106	0,055	1,92	106,253
7.1.3	H3	0,131	0,088	0,04	0,098	0,051	1,917	98,06

7.2.1	A2	0,147	0,096	0,042	0,112	0,058	1,955	112,466
7.2.2	A3	0,156	0,101	0,043	0,123	0,063	1,962	122,77
7.2.3	B2	0,135	0,088	0,038	0,105	0,054	1,969	105,407
7.3.1	B3	0,141	0,091	0,038	0,111	0,056	1,976	111,113
7.3.2	C2	0,127	0,084	0,037	0,097	0,049	1,956	96,577
7.3.3	C3	0,143	0,092	0,037	0,115	0,059	1,96	114,713
8.1.1	F3	0,219	0,139	0,049	0,192	0,101	1,902	192,069
8.1.2	G2	0,288	0,198	0,095	0,216	0,116	1,87	216,086
8.1.3	G3	0,207	0,129	0,044	0,181	0,095	1,919	181,486
8.2.1	H2	0,18	0,115	0,043	0,15	0,078	1,921	150,09
8.2.2	H3	0,181	0,115	0,042	0,152	0,08	1,904	151,505
8.2.3	A2	0,225	0,151	0,066	0,173	0,092	1,867	172,703
8.3.1	A3	0,204	0,135	0,056	0,162	0,086	1,892	162,029
8.3.2	B2	0,229	0,152	0,065	0,18	0,095	1,891	180
8.3.3	B3	0,21	0,133	0,048	0,178	0,093	1,914	177,848
9.1.1	D2	0,16	0,101	0,039	0,133	0,068	1,952	132,834
9.1.2	D3	0,152	0,097	0,038	0,124	0,064	1,94	123,657
9.1.3	E2	0,151	0,098	0,041	0,121	0,062	1,948	120,787
9.2.1	E3	0,151	0,098	0,041	0,121	0,063	1,931	121,223
9.2.2	F2	0,155	0,099	0,039	0,129	0,067	1,939	129,017
9.2.3	F3	0,154	0,101	0,042	0,124	0,065	1,924	124,382
9.3.1	G2	0,138	0,094	0,044	0,103	0,055	1,893	103,36
9.3.2	G3	0,154	0,099	0,04	0,125	0,065	1,928	125,043
9.3.3	H2	0,147	0,096	0,04	0,117	0,061	1,924	116,877

5.5.5. Limpieza y cuantificación ADN tras digestión Mung

Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
1.1.1	A2	0,09	0,066	0,038	0,053	0,029	1,856	52,929
1.1.2	A3	0,083	0,062	0,038	0,046	0,024	1,868	45,725
1.1.3	B2	0,088	0,067	0,042	0,048	0,026	1,865	47,584
1.2.1	B3	0,093	0,068	0,038	0,057	0,031	1,861	57,013
1.2.2	C2	0,079	0,06	0,037	0,042	0,023	1,857	42,232
1.2.3	C3	0,088	0,065	0,038	0,051	0,027	1,889	51,422
1.3.1	D2	0,074	0,058	0,039	0,035	0,019	1,858	35,188
1.3.2	D3	0,072	0,057	0,037	0,035	0,019	1,813	34,898
1.3.3	E2	0,076	0,061	0,042	0,034	0,019	1,848	34,449
2.1.1	A2	0,11	0,076	0,038	0,075	0,04	1,886	74,927
2.1.2	A3	0,093	0,068	0,039	0,056	0,03	1,884	56,138
2.1.3	B2	0,088	0,065	0,037	0,052	0,028	1,875	51,944
2.2.1	B3	0,106	0,075	0,038	0,071	0,038	1,876	71,06
2.2.2	C2	0,1	0,071	0,038	0,064	0,035	1,855	64,484
2.2.3	C3	0,099	0,071	0,038	0,064	0,034	1,863	64,044
2.3.1	D2	0,089	0,066	0,039	0,051	0,027	1,877	51,371
2.3.2	D3	0,098	0,071	0,04	0,061	0,032	1,875	60,554
2.3.3	E2	0,091	0,068	0,042	0,051	0,027	1,883	50,88
3.1.1	E3	0,073	0,058	0,04	0,034	0,018	1,898	33,58

3.1.2	F2	0,089	0,066	0,039	0,052	0,028	1,889	52,235
3.1.3	F3	0,087	0,066	0,041	0,048	0,026	1,86	48,333
3.2.1	G2	0,072	0,058	0,042	0,03	0,016	1,864	29,503
3.2.2	G3	0,063	0,053	0,041	0,021	0,011	1,899	20,857
3.2.3	H2	0,076	0,059	0,04	0,036	0,019	1,873	36,223
3.3.1	H3	0,07	0,057	0,04	0,029	0,016	1,853	29,369
3.3.2	A2	0,067	0,054	0,038	0,028	0,015	1,832	27,666
3.3.3	A3	0,075	0,058	0,039	0,036	0,019	1,855	35,626
4.1.1	B2	0,082	0,063	0,041	0,041	0,022	1,841	41,18
4.1.2	B3	0,08	0,061	0,038	0,042	0,023	1,834	41,929
4.2.1	C2	0,058	0,05	0,041	0,014	0,007	1,896	13,964
4.2.2	C3	0,077	0,059	0,038	0,039	0,021	1,852	39,343
4.3.1	D2	0,084	0,064	0,04	0,046	0,024	1,858	45,501
4.3.2	D3	0,072	0,056	0,038	0,034	0,018	1,87	33,88
4.3.3	E2	0,087	0,069	0,049	0,039	0,02	1,978	39,134
5.1.1	A2	0,102	0,072	0,038	0,066	0,035	1,881	66,32
5.1.2	A3	0,102	0,073	0,038	0,067	0,036	1,857	66,798
5.1.3	B2	0,097	0,07	0,038	0,061	0,033	1,881	61,382
5.2.1	B3	0,093	0,068	0,038	0,056	0,03	1,874	56,202
5.2.2	C2	0,108	0,076	0,038	0,074	0,04	1,858	73,643
5.2.3	C3	0,111	0,077	0,039	0,076	0,04	1,878	75,785
5.3.1	D2	0,097	0,07	0,04	0,06	0,032	1,901	59,984
5.3.2	D3	0,089	0,066	0,038	0,053	0,029	1,855	53,201
5.3.3	E2	0,046	0,044	0,041	0	0	2,867	0,491
6.1.1	A2	0,089	0,066	0,039	0,051	0,027	1,879	51,341
6.1.2	A3	0,092	0,068	0,039	0,055	0,029	1,872	55,128
6.1.3	B2	0,094	0,068	0,038	0,057	0,031	1,876	57,449
6.2.1	B3	0,093	0,068	0,038	0,057	0,03	1,892	56,54
6.2.2	C2	0,098	0,07	0,039	0,062	0,033	1,878	62,11
6.2.3	C3	0,103	0,074	0,038	0,069	0,038	1,832	68,785
6.3.1	D2	0,085	0,064	0,039	0,047	0,025	1,867	47,065
6.3.2	D3	0,091	0,067	0,038	0,055	0,03	1,853	55,238
6.3.3	E2	0,1	0,074	0,043	0,061	0,033	1,845	60,592
7.1.1	A2	0,083	0,063	0,038	0,045	0,024	1,827	44,634
7.1.2	A3	0,08	0,06	0,038	0,042	0,022	1,876	41,775
7.1.3	B2	0,094	0,068	0,039	0,058	0,031	1,887	57,562
7.2.1	B3	0,08	0,061	0,039	0,041	0,022	1,858	40,669
7.2.2	C2	0,09	0,066	0,038	0,054	0,029	1,874	53,517
7.2.3	C3	0,096	0,071	0,043	0,054	0,029	1,884	54,335
7.3.1	D2	0,078	0,06	0,039	0,039	0,021	1,877	39,245
7.3.2	D3	0,077	0,059	0,038	0,039	0,021	1,848	39,4
7.3.3	E2	0,08	0,063	0,042	0,038	0,021	1,84	37,74
8.1.1	E3	0,077	0,06	0,04	0,038	0,021	1,829	37,571
8.1.2	F2	0,07	0,056	0,039	0,031	0,017	1,851	31,156
8.1.3	F3	0,077	0,061	0,041	0,036	0,02	1,818	36,379
8.2.1	G2	0,084	0,066	0,043	0,041	0,023	1,771	41,418
8.2.2	G3	0,076	0,059	0,04	0,036	0,019	1,887	35,829
8.2.3	H2	0,069	0,056	0,039	0,029	0,016	1,803	28,764
8.3.1	H3	0,077	0,061	0,041	0,035	0,02	1,78	35,209

8.3.2	A2	0,073	0,057	0,037	0,035	0,019	1,85	35,379
8.3.3	A3	0,076	0,058	0,037	0,039	0,021	1,856	38,768
9.1.1	A2	0,091	0,067	0,038	0,054	0,029	1,876	53,577
9.1.2	A3	0,083	0,062	0,038	0,045	0,024	1,854	45,029
9.1.3	B2	0,081	0,061	0,038	0,043	0,023	1,842	42,73
9.2.1	B3	0,084	0,063	0,038	0,046	0,025	1,853	46,409
9.2.2	C2	0,085	0,065	0,04	0,046	0,025	1,834	45,715
9.2.3	C3	0,089	0,066	0,038	0,053	0,029	1,847	52,867
9.3.1	D2	0,091	0,067	0,04	0,053	0,029	1,847	52,845
9.3.2	D3	0,082	0,062	0,038	0,045	0,024	1,848	45,057
9.3.3	E2	0,1	0,073	0,042	0,06	0,033	1,854	60,478

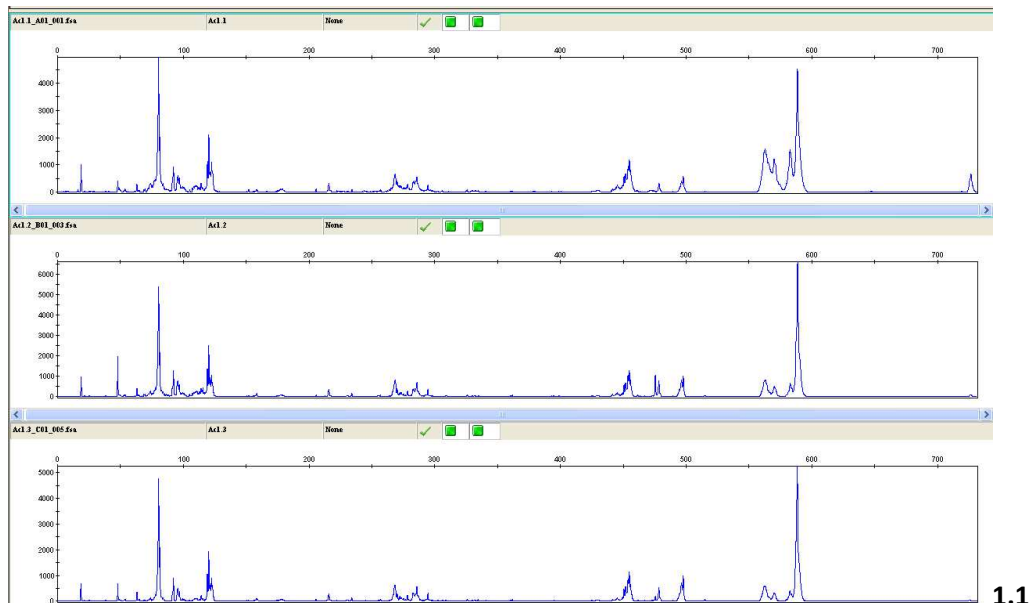
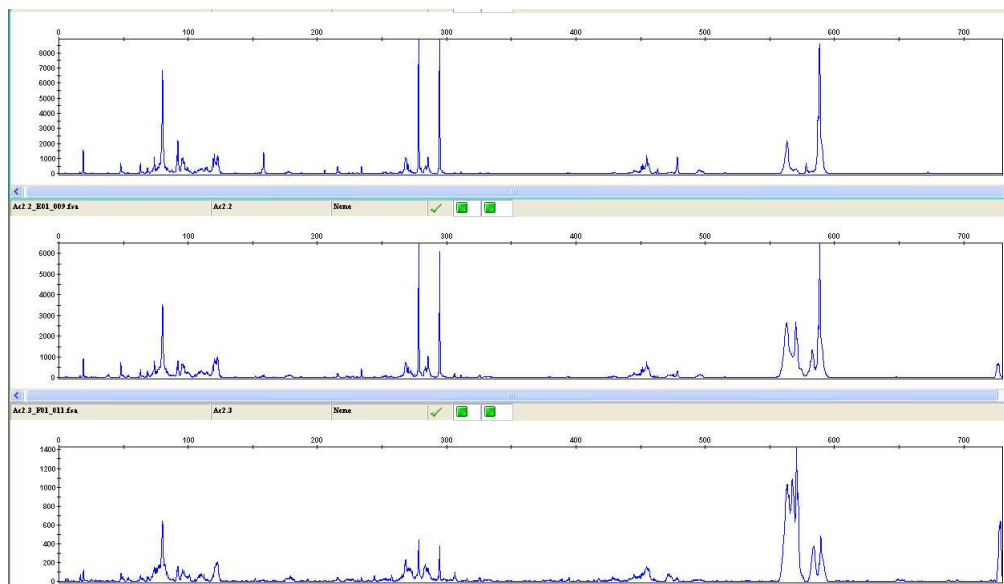
5.5.6. Limpieza y cuantificación ADN tras digestión TaqI

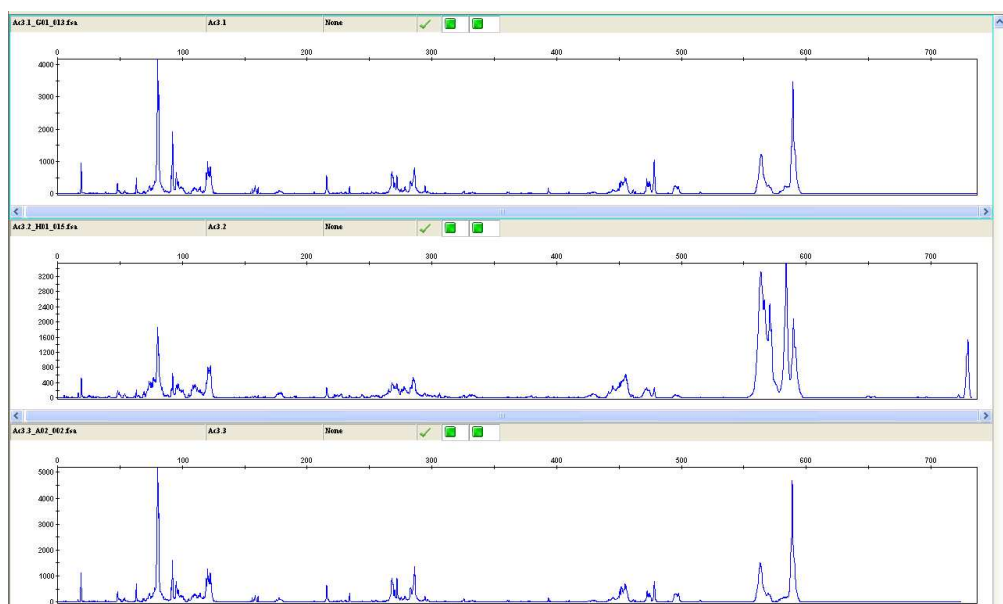
Muestra	Posición	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
1.1.1	A2	0,064	0,052	0,039	0,024	0,013	1,92	24,075
1.1.2	A3	0,142	0,124	0,094	0,049	0,031	1,574	49,302
1.1.3	B2	0,126	0,103	0,076	0,053	0,028	1,853	52,514
1.2.1	B3	0,128	0,107	0,079	0,05	0,028	1,796	50,492
1.2.2	C2	0,104	0,086	0,064	0,04	0,022	1,822	40,227
1.2.3	C3	0,063	0,052	0,039	0,023	0,012	1,879	22,734
1.3.1	D2	0,073	0,06	0,044	0,029	0,015	1,918	29,168
1.3.2	D3	0,25	0,207	0,15	0,108	0,062	1,748	108,187
1.3.3	E2	0,068	0,055	0,039	0,029	0,015	1,909	28,536
2.1.1								
2.1.2								
2.1.3								
2.2.1								
2.2.2								
2.2.3								
2.3.1								
2.3.2								
2.3.3								
3.1.1	E3	0,108	0,09	0,067	0,043	0,024	1,761	42,802
3.1.2	F2	0,165	0,138	0,102	0,068	0,038	1,783	68
3.1.3	F3	0,062	0,053	0,041	0,02	0,011	1,862	20,158
3.2.1	G2	0,108	0,089	0,065	0,045	0,026	1,758	44,956
3.2.2	G3	0,088	0,073	0,056	0,033	0,017	1,945	32,5
3.2.3	H2	0,165	0,137	0,101	0,068	0,038	1,792	68,08
3.3.1	H3	0,134	0,11	0,079	0,058	0,032	1,803	57,544
3.3.2	A2	0,188	0,158	0,118	0,074	0,041	1,786	73,706
3.3.3	A3	0,064	0,051	0,037	0,027	0,014	1,927	26,798
4.1.1	B2	0,157	0,13	0,096	0,064	0,036	1,791	64,424
4.1.2	B3	0,088	0,072	0,054	0,034	0,018	1,874	33,586
4.2.1	C2	0,083	0,072	0,059	0,022	0,012	1,841	22,317
4.2.2	C3	0,121	0,102	0,076	0,046	0,026	1,785	45,99
4.3.1	D2	0,2	0,174	0,137	0,068	0,039	1,723	67,586
4.3.2	D3	0,1	0,084	0,064	0,036	0,02	1,804	36,355
4.3.3	E2	0,068	0,057	0,044	0,024	0,012	1,935	23,923

5.1.1								
5.1.2								
5.1.3								
5.2.1								
5.2.2								
5.2.3								
5.3.1								
5.3.2								
5.3.3								
6.1.1								
6.1.2								
6.1.3								
6.2.1								
6.2.2								
6.2.3								
6.3.1								
6.3.2								
6.3.3								
7.1.1								
7.1.2								
7.1.3								
7.2.1								
7.2.2								
7.2.3								
7.3.1								
7.3.2								
7.3.3								
8.1.1	E3	0,229	0,19	0,139	0,098	0,055	1,763	97,762
8.1.2	F2	0,121	0,101	0,074	0,05	0,028	1,799	49,571
8.1.3	F3	0,064	0,053	0,042	0,021	0,011	1,926	21,078
8.2.1	G2	0,143	0,124	0,096	0,05	0,03	1,702	50,341
8.2.2	G3	0,144	0,12	0,09	0,058	0,032	1,8	57,643
8.2.3	H2	0,135	0,112	0,084	0,053	0,029	1,808	53,162
8.3.1	H3	0,1	0,084	0,063	0,037	0,021	1,809	37,216
8.3.2	A2	0,071	0,057	0,042	0,028	0,015	1,895	28,211
8.3.3	A3	0,119	0,101	0,075	0,045	0,027	1,681	45,486
9.1.1								
9.1.2								
9.1.3								
9.2.1								
9.2.2								
9.2.3								
9.3.1								
9.3.2								
9.3.3								

5.5.7. RFLPs

A Coruña (1.1, 1.2, 1.3)

**1.1****1.2**



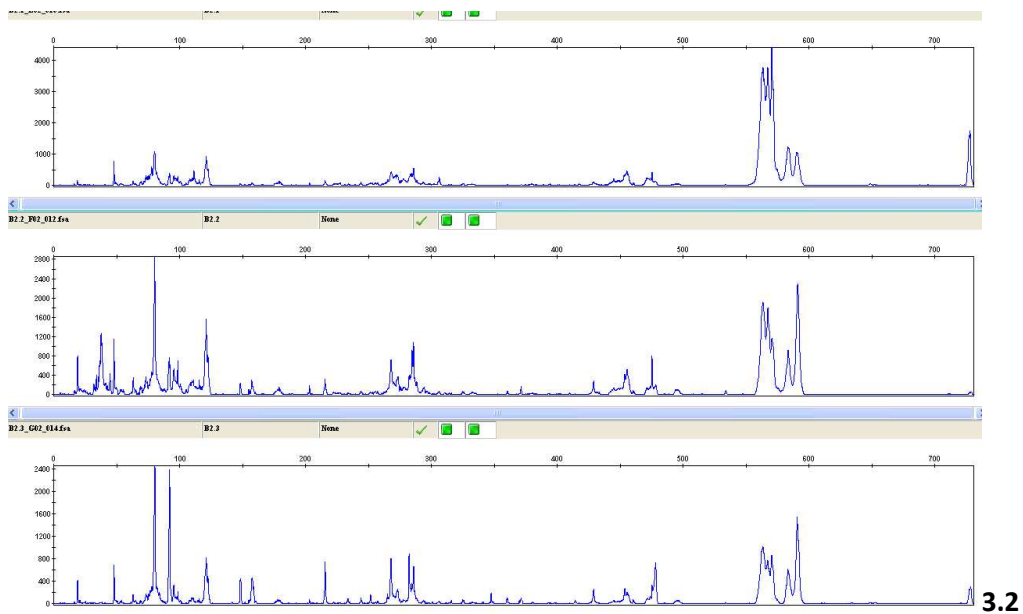
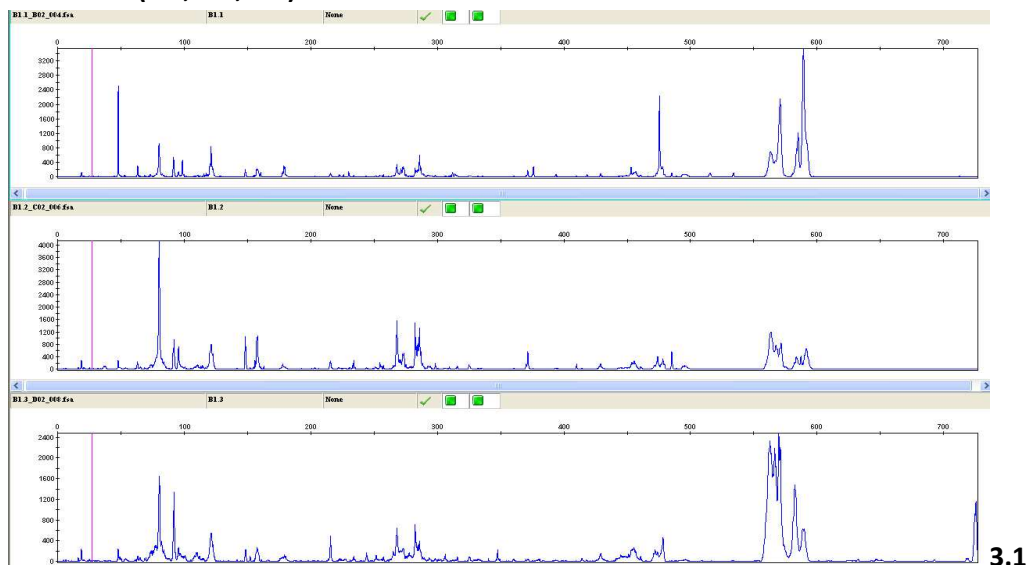
1.3

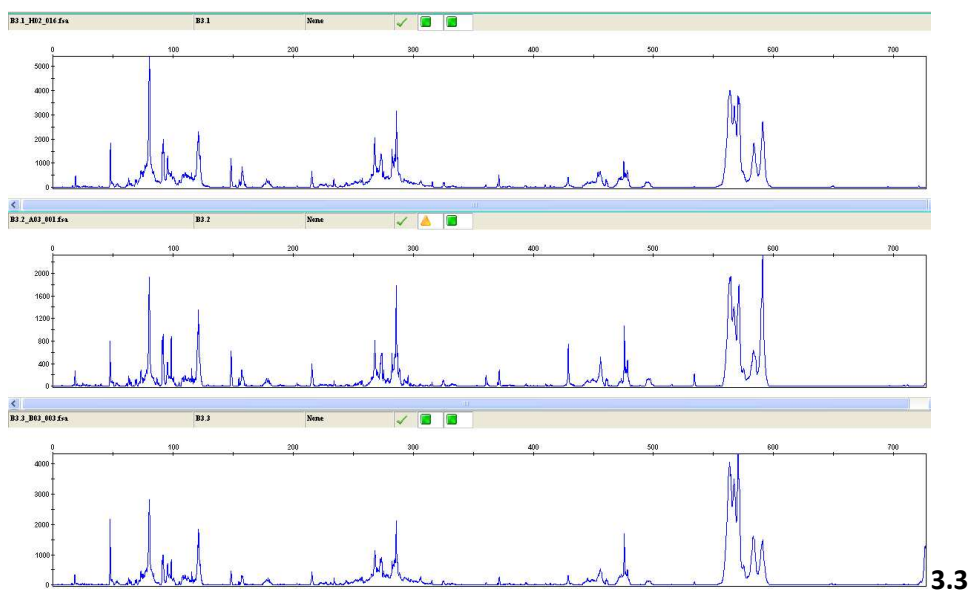
Fragmentos

1.1.1	1.1.2	1.1.3	1.2.1	1.2.2	1.2.3	1.3.1	1.3.2	1.3.3
63.1	63.11	63.09	63.07	63.16	80.16	63.17	63.18	63.14
73.3	73.3	77.89	68.62	68.62	122.6	73.93	72.26	73.39
73.92	73.92	80.32	72.15	73.21	268.35	76.94	73.32	73.84
75.37	77.87	81.25	72.95	73.93	278.3	77.77	74.38	75.28
77.04	80.37	91.29	73.93	75.28	294.55	80.27	75.37	76.85
77.88	81.3	92.14	75.37	76.95		81.11	76.84	77.87
80.3	84.0	95.64	76.76	78.06		83.98	78.04	80.19
81.23	91.27	96.87	77.78	80.29		91.17	80.25	83.72
83.93	92.11	114.36	80.2	82.81		92.1	81.08	91.18
91.24	95.58	119.13	82.71	83.92		95.1	83.86	92.02
92.08	96.9	120.2	83.93	91.32		96.8	91.29	95.11
95.66	99.62	121.18	87.57	92.17		98.77	92.22	96.8
96.79	108.03	122.43	91.23	95.18		99.62	95.4	98.68
99.62	109.42	123.23	92.07	95.84		114.43	96.62	99.62
108.14	110.55	215.68	95.18	96.97		119.28	98.31	100.51
109.27	110.98	268.03	95.84	99.62		120.25	98.78	108.35
110.23	112.9	268.72	96.97	100.26		121.23	99.72	109.31
114.17	114.04	270.09	98.11	107.16		122.38	100.6	110.17
119.2	115.62	278.39	99.53	108.2		158.37	107.27	111.04
120.26	116.41	282.76	100.43	109.6		215.57	108.22	113.31
121.24	117.2	283.36	107.17	110.38		233.98	109.34	114.01
122.4	119.05	285.85	108.03	111.08		267.91	110.38	117.25
123.29	120.2	294.59	109.6	112.13		268.77	112.11	119.27
215.69	121.18	450.55	110.38	113.09		270.14	114.1	120.24

ANEXOS

268.17	122.33	451.81	111.08	114.32	271.94	119.35	121.22
268.59	123.13	452.83	113.26	115.37	278.37	120.49	122.37
270.04	215.74	453.78	114.4	119.08	283.0	121.37	158.31
272.26	268.16	454.82	115.28	120.23	285.57	122.42	160.62
273.2	268.76	455.69	119.07	121.2	286.17	215.55	215.64
278.31	270.12	478.3	120.21	122.36	294.59	265.32	234.07
282.66	272.25	494.72	121.19	122.89	450.55	268.13	268.02
283.52	273.18	496.32	122.34	215.5	451.65	268.73	268.78
284.8	278.37	497.74	122.96	234.0	452.28	270.26	270.21
285.74	282.79		158.38	268.19	453.7	271.96	272.07
294.53	283.39		205.67	270.16	454.65	273.32	278.39
445.26	285.77		215.58	271.1	455.53	275.45	283.2
449.56	294.55		233.98	272.21	472.23	276.64	285.56
450.63	445.19		268.22	273.24	473.33	277.75	286.24
451.8	450.62		270.09	278.38	474.26	279.62	294.6
453.06	451.88		272.05	279.92	475.03	282.69	445.15
453.85	453.76		278.35	283.52	478.2	283.54	449.48
454.88	454.79		279.97	284.64	494.3	284.82	450.69
455.76	455.74		282.69	285.58	494.91	285.5	451.85
478.4	475.53		283.55	294.5	497.59	286.27	453.95
496.32	478.25		285.59	444.96		444.89	454.81
497.74	494.61		294.54	449.38		448.41	455.67
	496.22		445.09	450.63		449.47	472.46
	497.74		450.63	451.58		450.54	473.46
			451.72	453.01		451.64	474.45
			452.83	453.88		452.81	475.28
			454.72	454.68		453.59	478.3
			455.84	455.72		454.62	494.47
			463.23	478.3		455.41	495.16
			478.4			470.9	496.16
			494.61			472.15	497.66
			495.42			473.83	
						478.25	

Asturias (2.1, 2.2, 2.3)**Fragmentos****Barcelona (3.1, 3.2, 3.3)**



Fragmentos

3.1.1	3.1.2	3.1.3	3.2.1	3.2.2	3.2.3	3.3.1	3.3.2	3.3.3
63.25	63.12	74.38	73.22	63.21	76.86	63.1	73.2	63.11
80.14	76.67	75.46	74.46	72.23	77.88	68.76	77.97	73.28
91.6	77.79	76.93	75.37	73.21	80.39	69.72	80.3	74.36
98.6	78.45	78.04	77.12	74.28	82.06	72.26	91.15	75.47
120.38	80.31	80.44	77.76	75.56	92.08	73.23	91.9	77.05
121.18	83.77	82.2	80.16	76.67	95.37	74.29	95.38	77.99
122.77	91.29	83.96	81.74	77.78	98.68	75.74	98.58	80.33
157.21	91.95	92.04	83.77	80.2	120.52	76.75	115.57	81.83
158.02	95.54	95.59	91.3	83.93	121.23	78.13	120.46	83.89
178.67	120.23	121.38	92.04	91.33	122.55	80.44	121.18	91.22
179.37	121.3	122.62	95.5	91.98	148.21	82.01	148.3	91.97
268.03	122.55	148.31	96.62	95.47	157.57	83.86	157.21	95.56
271.33	148.21	157.57	98.59	97.07	158.92	85.99	215.64	96.69
272.86	155.89	215.55	108.26	98.68	215.57	87.29	268.05	98.58
273.45	157.36	265.07	110.17	100.69	267.95	88.22	270.11	100.61
282.35	157.91	268.05	111.47	107.97	272.38	91.39	272.51	107.77
284.55	215.04	271.36	120.41	108.66	273.14	92.13	273.46	108.47
285.91	215.55	272.55	121.2	109.45	282.43	95.59	273.97	109.44
286.93	234.0	273.15	122.62	110.15	284.56	96.62	275.35	110.23
375.95	254.69	282.35	268.17	111.02	285.92	97.18	282.39	112.26
453.12	267.99	284.56	270.3	115.58	429.0	98.78	283.42	115.62
475.49	270.12	285.84	271.4	120.44	453.83	99.72	284.7	118.46
477.43	270.97	347.52	272.42	121.15	455.65	100.68	285.91	120.51

ANEXOS

478.03	272.59	453.22	273.36	122.48	475.41	101.7	286.77	121.23
	273.36	453.93	277.69	148.21	478.22	105.28	288.66	148.21
	282.41	455.44	282.46	157.27		107.94	371.62	157.18
	283.17	456.63	283.65	215.59		108.46	429.08	157.91
	284.54	472.06	284.67	268.01		109.49	455.88	179.16
	285.91	478.32	285.95	270.05		110.18	475.73	215.63
	286.84		306.36	271.42		111.04	476.93	234.09
	371.34		444.92	272.61		112.17	478.39	255.49
	453.83		453.05	273.38		112.86		256.0
	455.57		453.84	273.8		114.33		257.37
	473.3		455.42	282.41		115.55		264.05
	474.14		471.18	283.35		116.33		265.25
	478.13		471.68	284.72		117.38		268.08
	485.13		472.6	285.91		118.16		270.22
			473.86	288.3		120.44		271.25
			475.38	428.99		121.23		272.37
				453.75		122.55		273.4
				455.64		148.21		275.37
				475.32		155.02		276.57
				478.3		155.94		277.68
						157.39		278.97
						177.86		280.17
						179.24		282.4
						180.28		283.34
						214.91		284.63
						215.58		285.92
						233.82		286.78
						244.13		288.24
						251.07		292.7
						251.75		293.9
						253.1		295.79
						254.71		306.17
						255.73		371.59
						257.51		429.11
						261.24		445.14
						262.51		454.2
						263.36		455.72
						264.21		460.56
						265.23		472.07
						265.9		473.17
						267.86		474.7
						270.06		475.72
						271.25		476.84

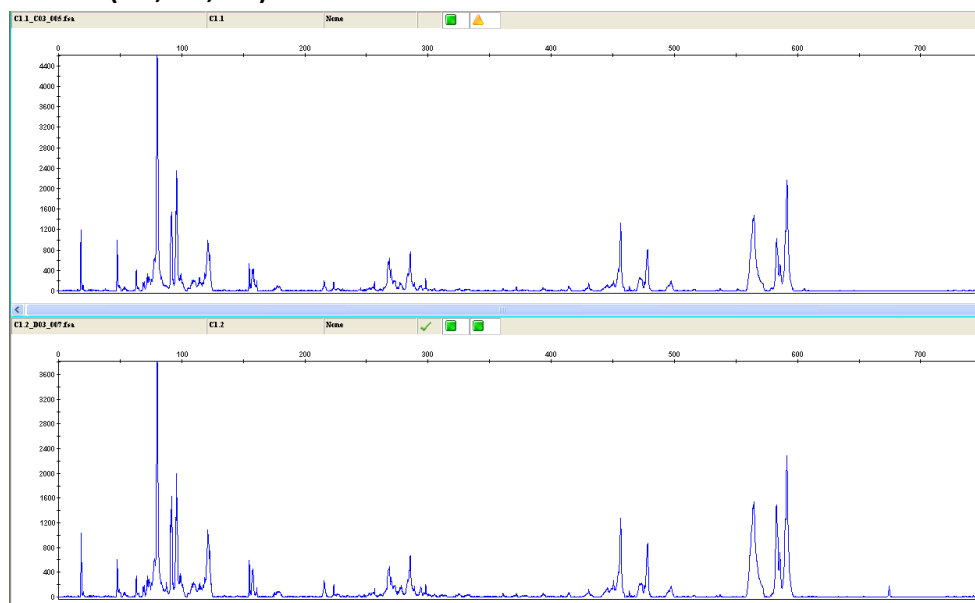
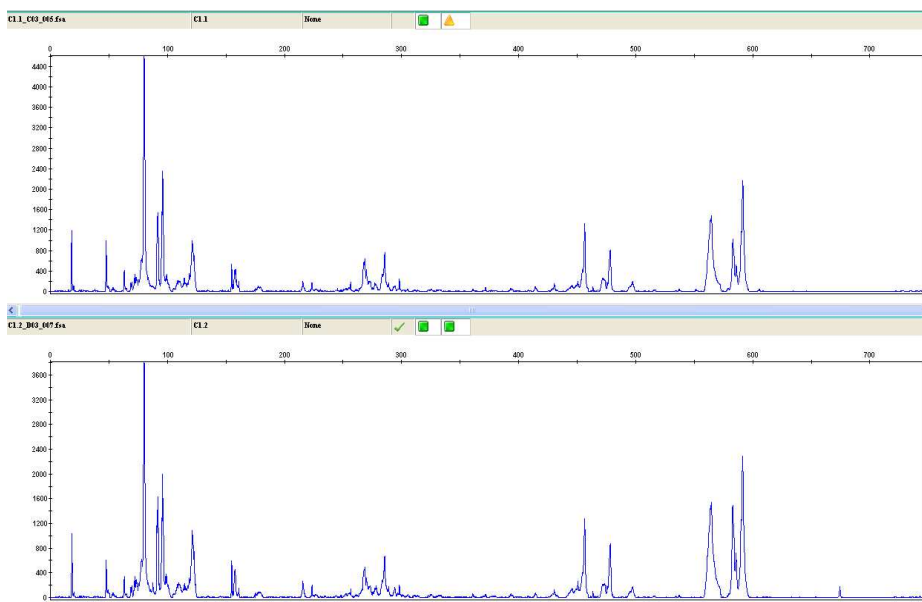
272.35	478.38
273.29	
275.41	
276.43	
277.71	
278.98	
280.17	
281.02	
282.38	
283.15	
284.59	
285.95	
288.42	
290.97	
292.42	
293.87	
294.72	
295.83	
297.7	
298.47	
305.65	
306.38	
315.86	
325.84	
371.28	
428.95	
444.92	
447.98	
448.95	
449.82	
450.39	
450.85	
451.71	
453.74	
455.55	
460.48	
461.28	
471.58	
472.83	
473.92	
475.27	
476.53	
478.15	

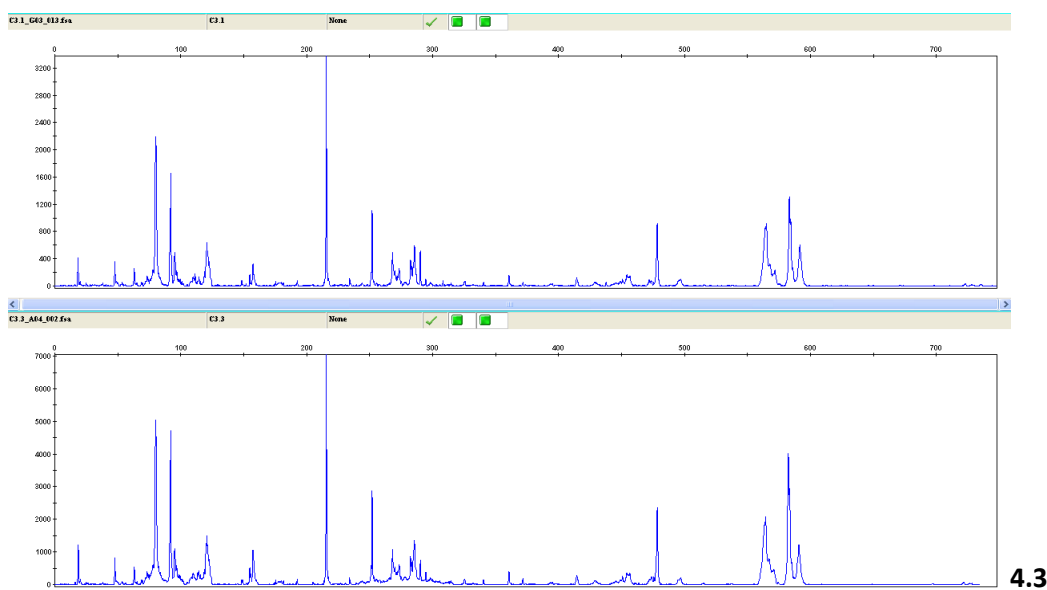
479.34

493.85

495.67

496.28

Cáceres (4.1, 4.2, 4.3)**4.1****4.2**



4.3

Fragmentos

4.1.1	4.1.2	4.2.2	4.3.1	4.3.2
63.09	63.17	63.08	63.12	63.12
72.09	72.12	68.77	77.61	72.12
73.18	73.28	69.65	80.22	73.29
75.38	75.47	72.14	91.2	74.19
77.73	77.61	73.3	92.05	75.28
78.2	78.08	74.1	95.26	77.99
80.17	80.13	75.46	96.78	80.13
83.66	83.59	78.14	118.82	82.38
91.14	87.53	80.18	120.78	83.6
92.0	91.11	83.53	122.57	91.96
95.33	91.96	91.17	157.36	94.04
95.9	95.17	92.02	215.53	95.27
98.66	95.83	95.2	251.9	96.68
99.52	98.58	95.86	268.11	98.58
108.5	99.53	96.61	270.1	99.53
109.47	108.58	98.78	273.46	107.91
114.44	109.37	99.53	282.44	108.52
118.73	110.16	100.69	283.22	109.65
121.15	114.41	108.54	285.56	113.51
121.78	118.69	109.42	290.14	114.4
122.69	121.2	110.3	478.27	115.54
154.79	122.73	111.35		117.4
157.37	154.79	114.09		118.73
158.1	157.64	116.04		120.06
267.89	215.57	116.93		120.68

268.66	267.89	117.81	122.46
269.96	268.75	118.62	154.84
283.59	270.04	120.94	155.66
285.66	283.64	121.56	157.21
298.1	285.61	122.55	215.51
450.63	450.63	154.78	217.29
453.25	453.24	156.17	234.0
454.68	454.68	157.45	250.98
456.36	456.36	158.28	251.92
471.42	471.58	175.23	253.45
471.92	473.11	215.58	265.94
472.77	473.53	268.06	268.07
478.34	478.25	268.67	270.11
		269.96	271.13
		272.8	272.24
		282.46	273.43
		283.15	275.22
		284.71	278.02
		285.74	278.96
		286.87	282.37
		444.93	283.22
		445.82	285.35
		446.88	286.71
		448.93	290.2
		449.82	294.55
		450.63	298.04
		451.75	360.57
		453.02	414.35
		454.71	450.7
		456.48	454.14
		471.78	455.71
		472.89	456.58
		474.34	473.82
		478.39	475.58
			478.37

Alcalá de Henares (5.1, 5.2, 5.3)

Fragmentos

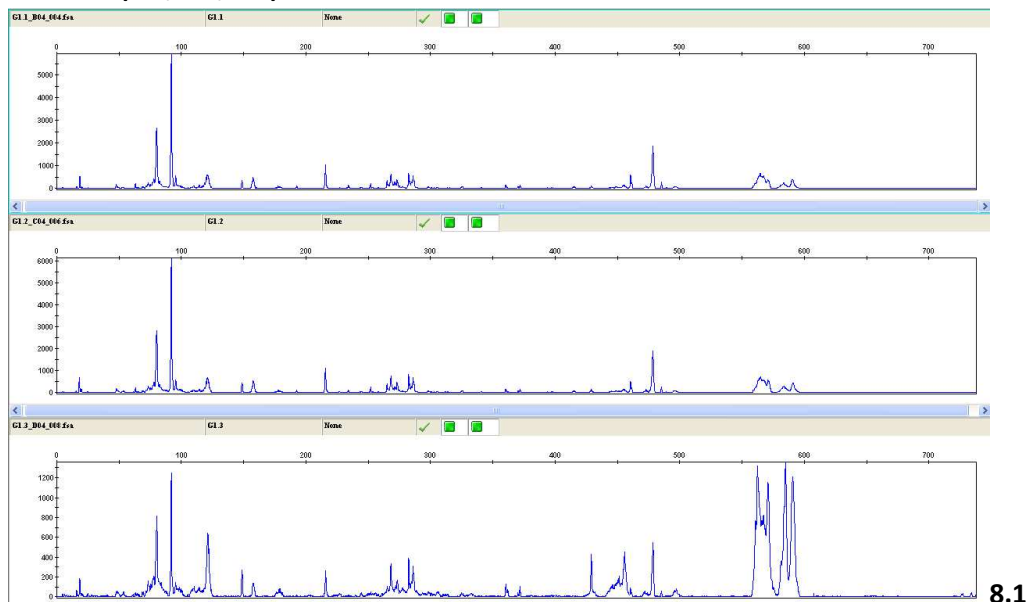
Valencia (6.1, 6.2, 6.3)

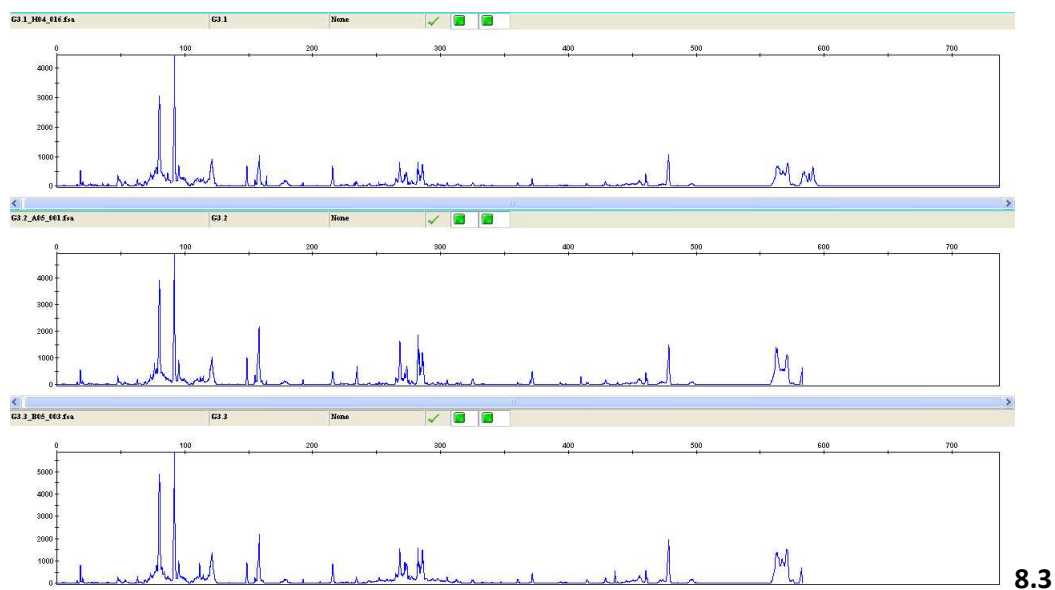
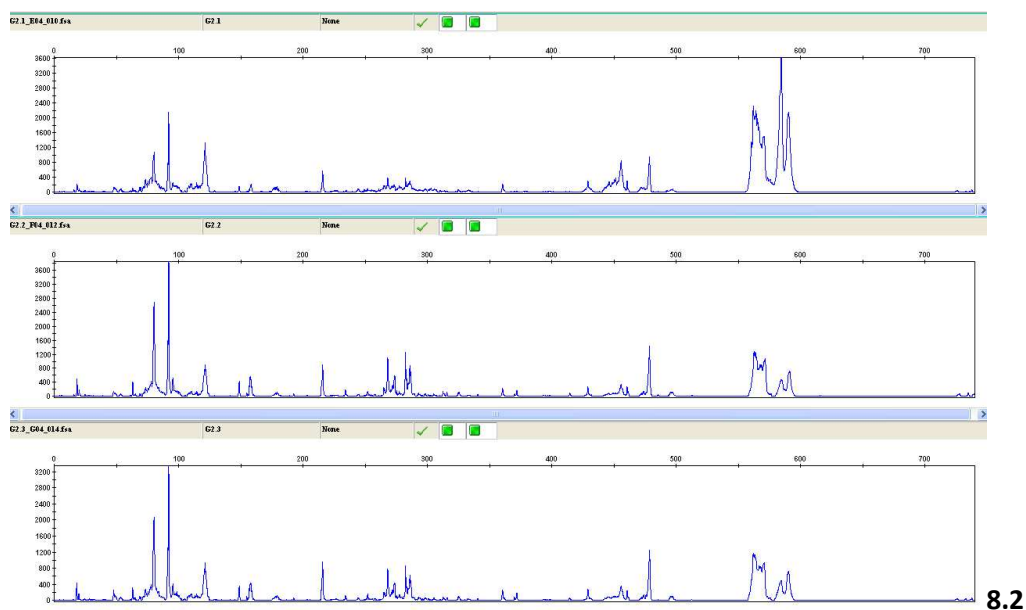
Fragmentos

Huelva (7.1, 7.2, 7.3)

Fragmentos

Granada (8.1, 8.2, 8.3)





Fragmentos

8.1.1	8.1.2	8.1.3	8.2.1	8.2.2	8.2.3	8.3.1	8.3.2	8.3.3
63.17	63.19	77.97	73.29	63.13	63.06	63.14	63.13	63.13
73.39	73.37	80.3	74.28	73.37	73.28	72.41	73.29	72.3
78.06	75.37	91.9	75.37	75.56	75.47	73.39	74.28	73.38
80.19	78.0	121.27	77.51	78.0	77.99	75.46	75.37	74.37
82.51	80.25	148.7	77.97	80.34	80.33	76.39	76.39	75.37
92.02	82.51	215.67	79.74	82.22	83.89	77.87	77.97	76.39
95.4	83.73	268.13	80.3	83.54	91.22	80.37	80.3	77.97
118.48	92.03	282.42	83.38	91.27	91.97	82.22	82.26	80.3

ANEXOS

119.81	95.44	286.03	91.24	92.03	95.37	83.9	83.84	82.17
120.78	118.4	429.01	91.99	95.34	98.58	84.83	84.69	83.94
121.32	119.83	451.27	95.28	120.72	120.6	86.69	85.9	86.93
148.71	120.73	455.82	109.49	121.34	121.32	91.27	86.84	88.15
157.48	121.9	478.49	110.19	122.06	121.94	92.11	91.99	91.24
215.56	148.79		114.6	148.8	148.7	95.39	95.28	91.99
251.86	157.55		118.49	156.82	156.73	96.7	98.68	95.28
265.01	215.55		120.72	157.55	157.55	98.68	99.53	96.6
268.17	251.86		121.34	214.83	158.1	99.62	110.26	98.68
271.25	265.04		158.18	215.6	214.88	100.6	112.27	99.53
272.02	265.82		215.61	265.0	215.65	108.39	114.47	100.52
272.96	268.15		268.13	268.1	265.04	109.61	118.55	108.27
282.36	271.17		282.38	271.97	268.14	110.31	119.88	109.58
283.13	271.94		284.53	273.78	272.01	112.41	121.31	110.28
284.59	272.98		285.81	282.4	273.3	114.6	148.7	111.6
285.96	282.38		286.76	283.09	282.42	118.57	154.93	113.36
286.73	283.16		360.45	284.56	284.57	119.81	158.12	114.51
460.51	284.71		428.99	285.93	285.95	120.7	215.7	116.98
461.4	286.01		445.13	286.62	286.64	121.41	234.15	118.58
478.5	286.7		446.19	360.26	360.3	148.71	234.75	119.83
485.29	460.4		448.32	429.0	428.95	154.93	265.03	120.72
	461.46		449.38	454.69	455.74	158.29	265.71	121.34
	478.42		450.47	455.58	460.52	164.01	268.19	148.71
	485.25		451.34	460.43	478.46	215.54	270.08	154.88
			452.61	478.49		264.98	271.19	158.28
			455.8			265.66	271.88	215.66
			460.49			267.97	273.76	234.16
			478.47			271.13	282.42	251.99
						271.9	283.19	264.98
						273.18	284.47	265.67
						282.34	285.85	266.61
						283.03	286.62	268.14
						284.57	324.93	270.11
						285.85	325.54	271.14
						286.62	371.7	271.99
						371.64	409.85	273.28
						460.43	454.68	275.24
						478.37	455.56	277.3
							460.56	279.1
							461.62	282.35
							478.56	283.12
								284.49
								285.77

286.63
288.17
288.69
289.37
293.57
298.03
304.99
371.75
428.94
436.41
454.75
455.63
460.54
461.6
478.49

Almeria (9.1, 9.2, 9.3)

Fragmentos



Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for the Forensic Examination of Non-Human Biological Traces

ENFSI-BPM-APS-01

Version 01 - November 2015



*With the financial support of the Prevention of and Fight against Crime Programme
European Commission - Directorate -General Home Affairs*

Background

This Best Practice Manual (BPM) belongs to a series of 10 BPMs issued by the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) in November 2015. The series covers the following forensic disciplines:

1. Forensic Examination of Digital Technology
2. Forensic Examination of Handwriting
3. Chemographic Methods in Gunshot Residue Analysis
4. Road Accident Reconstruction
5. Microscopic Examination and Comparison of Human and Animal Hair
6. Fingerprint Examination
7. DNA Pattern Recognition and Comparison
8. Application of Molecular Methods for the Forensic Examination of Non-Human Biological Traces
9. Forensic Recovery, Identification and Analysis of Explosives Traces
10. Forensic Investigation of Fire Scenes which have resulted in Fatalities*
11. Forensic Investigation of Fire Scenes which involve the Clandestine Manufacture of Improvised or Homemade Explosive Devices*
12. Forensic Investigation of Fire Scenes which Involve the Clandestine Manufacture of Illicit Synthetic Drugs*

* *The three specific areas on Forensic Investigation of Fire Scenes (numbers 10 -12) were combined into one BPM 'Investigation of Fire Scenes'.*

In the years 2014 and 2015, so-called Activity Teams have - in parallel - developed the 10 BPMs. The activities were performed within the project 'Towards European Forensic Standardisation through Best Practice Manuals (TEFSBPM)' and co-ordinated by the ENFSI Quality and Competence Committee. The realisation of the BPMs was supported by the Prevention of and Fight against Crime Programme of the European Commission – Directorate General Home Affairs (code: PROJECT HOME/2012/ISEC/MO/4000004278). The core project concept was that the BPMs will enhance the quality of the forensic services available to law enforcement and justice across Europe and thereby encourage forensic standardisation and cross-border cooperation between countries.

ENFSI expects that the issuing of this series will stimulate the improvement of already existing BPMs as well as the creation of new BPMs on disciplines that are not covered yet.

Acknowledgements

Luc Bourguignon (National Institute of Criminalistics and Criminology - Belgium)

José Carlos Cordero Pérez (Criminalistic Service of the Civil Guard - Spain)

Stijn Desmyter (National Institute of Criminalistics and Criminology - Belgium)

Balazs Egyed (Synlab GenID - Hungary)

Andreas Hellmann (Federal Criminal Police Office - Germany)

Irene Kuiper (Netherlands Forensic Institute - The Netherlands)

Zsolt Padar (Synlab GenID - Hungary)

Enrique Javier Santillana Reyes (Criminalistic Service of the Civil Guard - Spain)

Christina Staginnus (State Criminal Police Office Rheinland-Pfalz - Germany)

Official language

The text may be translated into other languages as required. The English language version remains the definitive version.

Copyright

The copyright of this text is held by ENFSI. The text may not be copied for resale.

Further information

For further information about this publication, contact the ENFSI Secretariat. Please check the website of ENFSI (www.enfsi.eu) for update information.

Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for the Forensic Examination of Non-Human Biological Traces

CONTENTS

1.	AIMS	4
2	SCOPE	4
3.	DEFINITIONS AND TERMS	5
4.	RESOURCES	7
4.1	<u>Personnel</u>	7
4.2.	<u>Equipment</u>	7
4.3.	<u>Reference materials</u>	7
4.4.	<u>Accommodation and environmental conditions</u>	7
4.5.	<u>Materials and Reagents</u>	7
5.	METHODS	8
5.1.	<u>General aspect</u>	8
5.2.	<u>Plan of examination</u>	8
5.3.	<u>Demands on the analytical method</u>	9
5.4.	<u>Peer Review</u>	17
6.	VALIDATION AND ESTIMATION OF UNCERTAINTY OF MEASUREMENT	17
6.1.	<u>Validation</u>	17
6.1.1.	Biological validation	17
6.1.2.	Technical validation	18
6.1.3.	Validation of interpretation	19
6.2.	<u>Estimation of uncertainty of measurement</u>	19
7.	PROFICIENCY TESTING	19
8.	HANDLING ITEMS	20
8.1.	<u>At the scene</u>	20
8.1.1.	Recognition of evidence	21
8.1.2.	Collection of evidence	21
8.1.3.	Preservation and packaging	21
8.1.4.	Transport	21
8.2.	<u>In the laboratory</u>	21
9.	INITIAL ASSESSMENT	21
10.	PRIORITISATION AND SEQUENCE OF EXAMINATIONS	22
11.	RECONSTRUCTION OF EVENTS	22
12.	EVALUATION AND INTERPRETATION	22
12.1.	<u>Evaluation of data</u>	22
12.2.	<u>Interpretation of data</u>	23
13.	PRESENTATION OF EVIDENCE	29
14.	HEALTH AND SAFETY	31
14.1.	<u>Risks for humans and the environment</u>	31
14.2.	<u>Risks for investigations</u>	32
15.	REFERENCES	33
16.	AMENDMENTS AGAINST PREVIOUS VERSION	34

1. AIMS

This Best Practice Manual (BPM) aims to provide a framework of procedures, quality principles, training processes and approaches to the forensic examination. This BPM can be used by Member laboratories of ENFSI and other forensic science laboratories to establish and maintain working practices in the field of forensic molecular genetic analysis of non-human biological traces (NHBT) that will deliver reliable results, maximize the quality of the information obtained and produce robust evidence. The use of consistent methodology and the production of more comparable results will facilitate interchange of data between laboratories.

The diversity in the type of traces within this field, the huge variability of population dynamics and the genetics of these traces as well as the development of new molecular tools and techniques (DNA/RNA), makes it undesirable to formulate best practices. The term BPM is used to reflect the scientifically accepted practices at the time of creating. Despite its implicit suggestion that alternative, equivalent Practice Manuals are excluded at beforehand, in this series of ENFSI Practice Manuals the term BPM has been maintained for reasons of continuity and recognition.

Some recommendations for the interpretation of the results of the analyses and the expression of the criminalistic value of these will be provided. These recommendations apply to NHBT and cover the advantages and disadvantages of their use in forensic casework.

It should be emphasized that this manual is made to encourage a systematic approach and high forensic quality without limiting the use of novel DNA/RNA tools or uncommon forensic traces. For that purpose the manual gives minimum requirements for effective validation and application rather than best practices. Recommendations are provided in order to align methodologies between forensic laboratories, allowing the exchange of knowledge, expertise and databases.

2. SCOPE

This BPM is aimed at experts in the field and assumes prior knowledge in the discipline. It is not a standard operating procedure and addresses the requirements of the judicial systems in general terms only.

It serves as a framework for the minimum requirements and recommendations for the molecular genetic analysis of NHBT in forensic casework. Forensic casework starts at the crime scene where the collection and securing of traces should be done in a methodical manner to ensure as many analytical methods as possible can be used. The next step in the process is examining and describing traces to formulate an analytical plan. The analytical plan is dependent on the forensic question, available technologies, preservation of trace evidence and the criminalistic value of the analytical results.

This framework includes the securing of NHBT at the crime scene and from pieces of evidence, their examination and subsequent analysis using molecular tools, the interpretation of data and formulation of a forensic report. Additional tools and methods such as immunology and isotope analysis are applicable but are not addressed in this manual.

In contrast to investigation of human DNA-traces, there are no restrictions concerning DNA loci and privacy of genetic information from animals, plants and microorganisms. A wide range of technologies can be applied due to the wide spectrum of genetic information (DNA, RNA) and organization (e.g. inheritance, reproduction strategies) which may be encountered.

When DNA- or RNA-markers are recommended, this is only done in order to facilitate the

exchange of data and the alignment of methods and databases, without giving more value to these markers or devaluing other markers that meet the same minimum requirements. Tools such as DNA/RNA-markers can be highly variable within different populations and new tools are developed on a regular basis.

For example, individual typing using nuclear DNA-markers like STRs in both plants and animals requires the same instrumentation, reagents and technical expertise, while the final results can have very different criminalistic value if profiles are generated from plants which can easily propagate clonally (like Cannabis) or when profiles are generated from traces of a dog.

For certain types of species and biological traces additional recommendations for the interpretation of results are provided to highlight the limitations and restrictions.

3. DEFINITIONS AND TERMS

For the purposes of this Best Practice Manual (BPM), the relevant terms and definitions given in ENFSI documents, the ILAC G19 “Modules in Forensic science Process”, as in standards like ISO 9000, ISO 17000 and 17020 apply.

16S/12S rRNA gene	genes located on the genome encoding 16S/12S rRNA
-A peaks (or double peak)	PCR artefact that is one nucleotide shorter than the amplified PCR product (allele)
allele	possible status of a gene in a certain locus in the genome
allelic drop out	preferential amplification of one out of two alleles due to mutations in the primer binding regions and/or low amount and degradation events of target DNA
amplicon	defined DNA stretch amplified by PCR
blind trial	internal quality measure using reference samples to ensure the correctness of the results
BOLD	Barcode of Life Data Systems; nucleotide sequence database devoted to taxonomic studies and online platform for DNA sequence analysis à http://www.boldsystems.org/
bp	base pair
carry-over	unintentional transfer of biological material (including DNA) between the analysed samples
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
CE	capillary electrophoresis; analytical method allowing the separation of DNA molecules according to their molecular weight
CE	collaborative exercise
chemotyping	determination of a biochemical phenotype (chemotype) on the DNA/RNA level
COI	cytochrome oxidase I; gene located on the mtDNA
cpDNA	chloroplast DNA; portion of the genome located in the chloroplast
cytb	cytochrome b; gene located on the mtDNA
D-Loop	displacement loop; noncoding structure occurring in mitochondrial circular DNA molecules
drop in	additional allele in a genetic profile due to PCR artefact (e.g. stutter) or unintentional contamination

family	taxonomical classification, family comes between order and genus
GENBANK	open access nucleotide sequence database produced and maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) à http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
genetic profile	combination of alleles of multiple genetic markers in an individual being
genus	taxonomical classification, genus comes between species and family
GroEL	gene found in a large number of bacteria required for the proper folding of many proteins
INDEL	insertion or deletion of bases (1 – 50 nucleotides)
ITS	internal transcribed spacer; sequences located on the ncDNA
Locus	certain position in the genome
LSU	Large subunit 25-28S ribosomal RNA
Marker	synonym to locus, carrying one or multiple alleles
match	identical alleles in all markers investigated, the DNA profile obtained from two samples are indistinguishable
matK	gene located on the cpDNA
mismatch	divergence in alleles of two genetic profiles compared
mtDNA	mitochondrial DNA; portion of the genome located in mitochondria
ncDNA	nuclear DNA; genome located in the nucleus
NGS	next generation sequencing; high-throughput sequencing technologies for DNA molecules
NHBT	non-human biological traces; biological evidence material of non-human origin
PCR	polymerase chain reaction; molecular technique allowing the amplification of a defined DNA molecule
Primer	oligonucleotide used as starter molecule in a PCR reaction
PT	Proficiency Test
pull-up peaks	false signal due to the detection system/electrophoresis
rbCL	gene located on the cpDNA
RISA	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
SNP	single nucleotide polymorphism; variation in a single nucleotide position of a DNA sequence
species	taxonomical classification of a group of organisms capable of cross-breeding (and for animals capable of producing fertile offspring)
spikes	signals not derived from DNA, they generally appear in all detection channels of the CE and are sharper than regular peaks
STR	short tandem repeat; class of short repetitive sequences revealing variable numbers of their basic repeat unit in a tandem array
stutter peaks	PCR artefact that is usually one repeat shorter (or longer) than the amplified DNA product / allele
taxonomic typing	determination of a taxon on the DNA/RNA level
tRFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
trnL/F/H	gene located on the cpDNA
psbA	gene located on the cpDNA

4. RESOURCES

4.1. Personnel

Personnel should be educated in accordance with national rules and regulations. They should be formally educated or trained in the application of current molecular methods. This includes also knowledge of what is commonly accepted in the field and awareness of emerging fields. Experts writing reports should be aware of differences of the area of expertise to the nearest related fields (e.g. like human DNA) due to ecological aspects and genetic background of the species investigated (see Chapter 6 and 12) and they should be aware of new developments in related fields.

4.2. Equipment

The equipment should fulfil the specific requirements of the field. In general, instruments for DNA extraction, amplification, separation and detection are required. The specific software should be chosen according to the applied method.

4.3. Reference materials

Commercial reference materials for all taxons investigated are usually not available in this field. Reference materials can be obtained from specific botanical, microbiological and zoological collections as well as from recognized scientific or research institutes working with those taxons or from other verified collections/samples (e.g. veterinary or zoological). Internal field specific collections provided by a forensic laboratory are accepted.

If a reference database contains non-domesticated species, voucher specimens should be used. The database should contain specimens that belong to the relevant population, both geographically and temporally.

There is no consensus regarding reference DNA sequences (e.g. mtDNA) for non-human species in the forensic community. The first sequence scientifically published or deposited in an online scientific database is typically accepted as a reference DNA sequence to which questioned sequences are compared (Budowle et al., 2005). This can be problematic for haplotyping if the reference sequence describes a rare haplotype or if the reference sequence is shorter or misses informative sites, making annotation sensitive to mistakes.

Internal and positive controls should be validated before being used in casework. Technical references are provided by the manufacturers.

4.4. Accommodation and environmental conditions

Incompatible activities within a laboratory (e.g. pre- and post-PCR procedures and samples; trace and reference material, between different pieces of evidence) should be separated in order to prevent contamination and carry-over.

Special care is recommended for the contamination caused by the environment and/or by reagents such as:

- bovine serum albumin in reagents
- pollen and spore contamination through the air
- bacterial DNA remnants in polymerases

4.5. Materials and Reagents

Changing the supplier of materials and reagents (e.g. buffers) may change the results significantly (e.g. overcome null alleles) and demands a review of the validation process.

5. METHODS

This chapter will not provide any standard operation procedures but provides guidance on systematic approaches to be followed in field specific examinations. It gives minimum requirements and recommendations for the selection of adequate analysis protocols and the order of their application in forensic casework. Typical pitfalls will be demonstrated.

5.1. General aspect

Three questions will be addressed regarding NHBT in forensic casework as well as methods and approaches to answer them:

- (i) What is it?
- (ii) To whom or to what does it belong?
- (iii) Where does it come from?

The first question (i) can be answered by determining the family, genus, species (i.e. a taxon) name or a haplotype. Taxonomic typing can be used to find out whether a crime has been committed (e.g. the handling of illegal plants, mushrooms, wildlife) or, in a closed setting, to exclude or include its origin from the crime scene.

The second question (ii) requires techniques with greater discriminating power to individualize a trace or identify its origin. A match may indicate a link between a piece of evidence and an individual donor. The first stage involves taxonomic typing, while additional typing with other markers is required (e.g. STRs, SNPs or mtDNA analysis/haplotyping) in order to determine whether traces have the same donor.

The third question (iii) is to establish the geographical and/or genealogical origin of certain traces. This can be achieved by assigning traces to a certain population of origin, or by taxonomic typing if species are restricted to certain geographical areas.

In addition to these three main questions, more unusual questions can be asked. The evidence may be assigned to a group of individuals within a species, for example a cultivar, a subspecies, a chemotype or male and female individuals. The origin of a sample may be determined by identifying the composition of microbial taxa (microbiome) and assigning it to certain area of origin.

Several DNA-sources within the cell can be used: nuclear DNA (ncDNA), mitochondrial DNA (mtDNA) and chloroplast DNA (cpDNA), along with RNA and plasmids. Each of these sources has its own defining characteristics limitations, applicability and final evidential value. Differences in inheritance and availability in different tissues will influence the efficiency of the examination.

Non-human forensics – in contrast to human forensics – requires the development of new specific markers for every newly investigated group of organisms, as most markers are highly specific and work only in a limited set of related species.

The different reproductive strategies of organisms also play an important role in how the DNA/RNA methods can be applied to taxonomic typing, chemotyping, individualisation or geographical/genealogical assignment of NHBT.

5.2. Plan of examination

All examinations should be implemented following a plan of analyses and the results should finally provide adequate answers to the forensic questions identified. The plan must consider

the potential for destruction of evidential material during analysis and/or the potential need for further analysis. Where limited evidential material is available, the efficiency of the chosen techniques should be considered.

The methods applied may include (species-specific or taxon-specific) PCR, analysis of short tandem repeats (STRs), nucleotide-sequencing or hybridization techniques (addressing DNA polymorphisms e.g. SNPs and INDELs). If the respective technique has not been applied in forensic investigations previously a validation process is required (see Chapter 6).

Adequate presumptive testing is required to allow the minimum sampling and maximum efficiency of the molecular method. Before selecting appropriate techniques, all prior information must be carefully considered.

Positive and negative controls are required for each analytical technique and may help to detect inhibiting agents or the loss in activity of reagents. The implementation of extraction controls may be helpful to detect contamination during the stages of analysis. The selected analysis should be appropriate for the quantity of the target DNA/RNA in the sample and genetic divergence of the population.

Reference samples and forensic databases are of key importance, however the potential for misleading information must be considered if using open source databases. The databases applied for individualization as well as for taxonomic or population assignment should cover a broad spectrum of species, relevant populations and sufficient variation within populations, respectively. Determination of the origin also requires ecological expertise.

5.3. Demands on the analytical method

(i) **What is it? Taxon identification**

The first step in any of the suggested procedures is sample preparation. Possible subsequent analytical methods have to be envisaged and obvious characteristics of the sample (e.g. is it a mixture?) may have an impact on the preparation method (e.g. should it be homogenized or pooled?). The limitation of a forensic sample batch has to be taken into consideration for all subsequent analyses.

DNA (or RNA) is then extracted from the prepared sample and quantified. This may be assessed by various quantification techniques such as spectroscopy, fluorometry, gel electrophoresis or real-time PCR, each with advantages and/or disadvantages. However these procedures will consume a certain portion of the (potentially limited) sample and the measured values represent total DNA (RNA), not necessarily target DNA (RNA).

If the evidential sample does not provide any morphological indications regarding the kingdom or family of the donor and no prior information is available, the amplification of a region with taxon-specific polymorphism using universal primers and subsequent sequencing of the amplicon is the general approach.

The following target sequences are currently recommended:

- Cyt b, COI, 12S and 16S rRNA genes (mtDNA; for animals/mammals)
- ITS (ncDNA), trnL-trnF, rbCL/matK, psbA-trnH (cpDNA; for plants)
- ITS and LSU (ncDNA; for fungi)
- 16S rRNA genes (bacterial DNA)

The markers used by the members of the APST are listed in the ENFSI APST Working Group database, held on the APST site of the ENFSI intranet.

If the DNA sample is degraded and the above mentioned sequences cannot be amplified, non-coding D-Loop sequences (mtDNA) may be chosen as an adequate target for mammal species. Since universal or degenerate primers are commonly used in this approach, the target quantity (i.e. copy number of ncDNA and mtDNA) of the extracted sample may have an impact on the results (e.g. nuclear pseudogene copies of a mtDNA target may be amplified) or preferential amplification of one target in a mixture of several may occur and should be considered during evaluation.

If a readable sequence is achieved by this procedure a database must be searched to compare the sequence to similar or identical sequences derived from annotated sources. Both the National Institutes of Health (NIH) genetic sequence database GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and the Barcoding of Life (BOLD) Systems databases (<http://www.boldsystems.org/>) provide public access. GenBank (NCBI) is cross linked to the DNA DataBank of Japan (DDBJ) and the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and harbours a wide variety of different sequences, but it lacks editorial surveillance and may contain incorrect annotations. The BOLD databases are annotated by taxonomists and reference samples are provided upon request. However these databases comprise only a limited set of genomic targets and sequence alignments are partly inaccessible. Next to these, various smaller, specialized databases exist which may also be used for forensic purposes (see also Chapter 12). If verified reference samples of the species (taxon) indicated by a database match are available, additional sequencing of these is recommended. A direct sequence alignment may confirm (or precise) species (taxon) assignment (Linacre et al., 2011). Species assignment will be affirmed by the exclusion of the nearest neighbours.

If the evidence sample consists of a mixture of DNA templates, the interpretation of sequencing results is hampered. If the processing of raw data and manual sequence analysis (e.g. extraction of predominant signals from a mixture) does not provide readable sequences, the following alternative approaches for taxon identification may be applicable:

- Switching from nuclear to less ubiquitous non-nuclear targets that are characteristic of one part of the mixture (e.g. cpDNA sequences which are restricted to green plant tissues).
- The application of species (taxon) specific PCR for nuclear or non-nuclear (mtDNA or cpDNA) target sequences. This may be applied as a single analysis or in combined sets. For example, species (taxon) specific primers can be used in combination with conserved priming sites and in multiplex PCR reactions as available for mammals (Tobe and Linacre, 2008 and Pereira et al., 2010).

Taxon-specific PCR markers may also be chosen as a direct approach where specific species (taxons) are to be excluded or identified: more prior information or prominent morphological features narrow down the assumed set of taxa.

Specific nucleotide positions may be investigated for taxon-specific polymorphisms in a SNP assay. Next to sequencing, techniques based on primer elongation, such as minisequencing (SNaPshot analysis), allow the interrogation of single SNP positions.

Hybridization techniques may be applied for taxon identification. Microarrays with species (taxon) specific oligonucleotide probes (e.g. those derived from bacterial 16S rRNA gene sequences) fixed on solid supports are most commonly used. The oligonucleotide chip may be self-designed for a choice of targets and/or the oligonucleotide sequence that is presented on the surface of the slides. The oligonucleotides are hybridized to DNA or RNA that has been extracted from the forensic sample.

The investigation of regions revealing taxon-specific polymorphism may also use next generation sequencing (NGS) techniques. Mixed template sources can be resolved since these techniques display the nucleotide sequence of every single molecule that is subject to the sequencing reaction in parallel.

Should the forensic question require an individual identification next to taxon identification, an immediate STR analysis using taxon specific primers may answer both questions at the same time and economize the use of the sample.

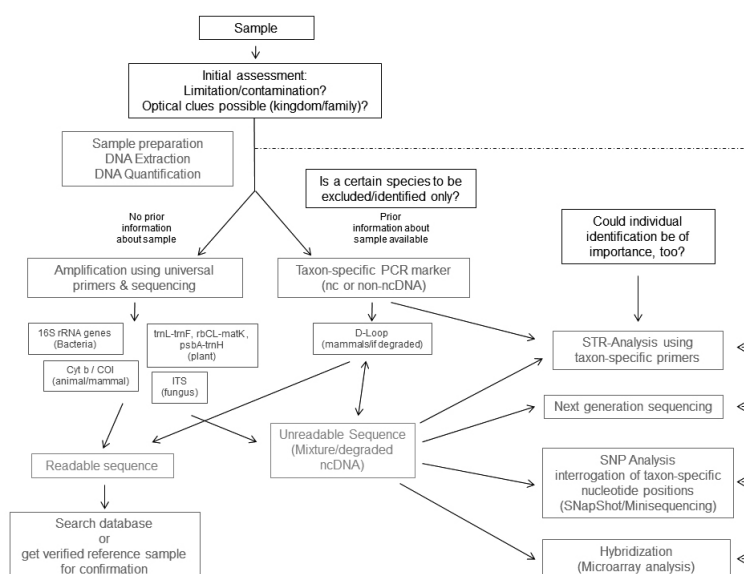


Fig.1: Taxon identification - What is it? Overview of general working stages and possible strategies. The flow diagram shows questions and information necessary for a decision (black), helpful techniques (red), suggested markers (blue) and data generated (green). The suggested flow of work is indicated by arrows, however this is not obligatory.

(ii) To whom or to what does it belong? Individualization

For an individual identification of a NHBT the genetic information gained from the sample has to be as distinctive as possible and should subsequently be compared to a reference sample for the assumed individual.

The most powerful methods for this task are taxon-specific STR markers (preferably tetrameric repeat systems) and/or polymorph nucleotide positions (SNPs) by PCR and capillary electrophoresis, Sanger Sequencing or NGS.

In some cases markers have previously been used in forensic applications (e.g. cattle, pigs, horses, dogs, cats, deer, birds of prey) and if not, existing marker-sets may be reformed and (re)-constructed (see the database of the ENFSI APST Working Group, held on the APST site of the ENFSI intranet). Those analyses which apply new markers that have not been used for forensic applications previously require preliminary validation in accordance with forensic standards, concerning both unambiguous allele identification and inheritance. The wide range of living forms with special genetic phenomena requires additional information or contribution from dedicated specialists.

The analyses result in a set of combined alleles of the chosen genetic markers that are recorded as genetic profiles. The necessary number of markers for individualization depends on the given species, populations and the number of alleles recorded. The obtained genetic profiles can be classified to full, partial or mixed profiles (with or without single allele drop in/out; see Chapter 6). Those suitable for comparison lead to either a match (identical alleles in all investigated markers) or mismatch (divergence of alleles). The latter leads to an exclusion (i.e. the questioned and known samples are not derived from the same individual). It must be considered that several individuals may share the same genotype due to the prevalent mode of propagation (see (iii)).

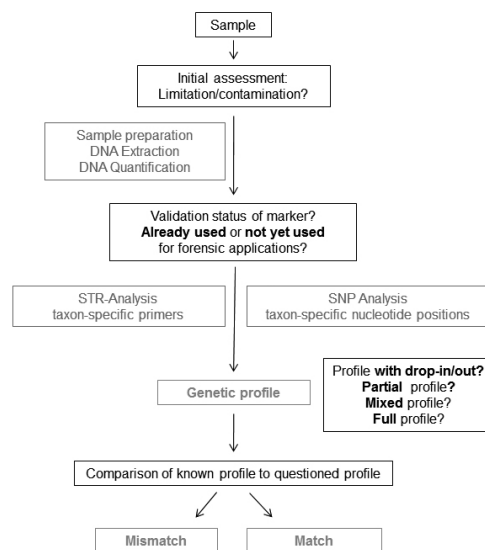


Fig.2: Individual identification - To whom or to what does it belong? Overview of general working stages and possible strategies. The flow diagram shows questions and information necessary for a decision (black), helpful techniques (red) and data generated (green). The suggested flow of work is indicated by arrows, however this is not obligatory.

(iii) Where does it come from? Geographical or genealogical origin

Determination of a population of origin or the geographical origin

For some forensic questions a certain “group of individuals” has to be determined from which the sample in question may originate. This could either be a population located in a specific geographical area or a distinct genealogical group such as a breeding lineage or direct kinship descent.

Two factors may have an impact on the strategy and the marker system chosen for the determination of the population of origin.

a) *The habitat*

- If the sample in question belongs to a species that is restricted to a fixed habitat, species identification (as shown in i) is a sufficient strategy to determine the geographical origin of a representative of this species.
- If a species is more prevalent geographically or if the habitat harbours different populations, the population of origin must be assessed in order to identify the geographical origin of the sample. To assign a sample to a certain population a DNA marker system is required which detects genetically distinct alleles shared by all individuals of the target population and is absent or less abundant in other candidate populations and thereby differentiates between both; however such a marker system may not always be available.

b) *Mode of reproduction*

Different levels of genetic variation in the progeny result from various modes of reproduction in non-human organisms, especially in plants, or from breeding of domesticated species. This may lead to populations of varying divergence:

- Cross-breeding (outbreeding) species mostly reveal large genetic differences in their populations and therefore a distinct genotype allows individual identification (see ii).
- In selfing species, inbreeding populations and species performing clonal propagation or apomixes, the genetic variation within the offspring is reduced and individuals with identical genotypes may occur.

The degree of genetic exchange between different populations plays an important role when determining the strategy used for identification, therefore the existence of population databases and allele frequencies reflecting the diversity among and between individuals is of major importance. However the quality and quantity of population data can be diverse. In particular, the collection of population data for rare or endangered species may be problematic.

- If the existing population data reveal a highly divergent population that is isolated from others (e.g. by geographical barriers), without gene exchange with other populations, members will share the same type of genetic differences and exhibit discrete types of variation when compared to other populations. Fixed alleles exist and may be detected by SNP or sequence variation analysis of mtDNA. Hypervariable D-loop haplotypes in particular are found to be specific for certain populations, therefore all other populations can be excluded as the source of origin for a matching sample.
- If the existing population data reveal a less differentiated population with some limited gene exchange, mtDNA variation might be rare and markers located in the nuclear genome, such as STRs and SNPs have to be employed. Some alleles may be distributed across populations, however different frequencies between populations may allow differentiation.
- If no population data is available or the population reveals a high gene exchange, (i.e. the allele frequencies are more or less equal among different populations) no genetic method can be applied and other methods (e.g. isotope analysis) have to be employed to determine the geographical origin of the sample.

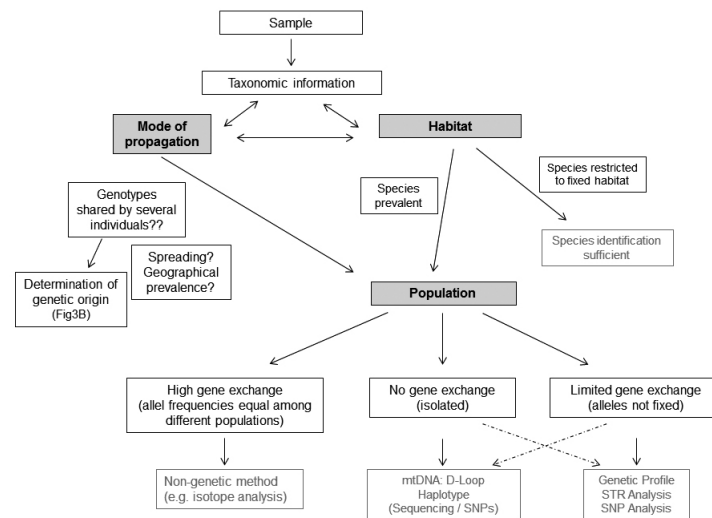


Fig.3A: Determination of the population of origin (geographical origin) - Where does it come from? Overview of general working stages and possible strategies. The flow diagram shows questions and information necessary for a decision (black) and helpful techniques (red). Important information is shaded grey. The suggested flow of work is indicated by arrows, however this is not obligatory.

Determination of a genetic origin (kinship or breeding lineage analysis)

The ability to verify or refute familial relatedness is an important application for non-human forensic investigations. In wildlife investigations such as illegal trading or poaching, it may be necessary to differentiate between animals bred in captivity and wild animals. This may also apply for plant species (e.g. vegetative propagation by cuttings). A common genetic origin or parent-offspring relationship can be evidenced by genetic markers that are inherited sexually from one generation to the next or passed on to a non-sexual descendant.

In case of sexual reproduction in outbreeding diploid species, parentage and other kinship relations can easily be confirmed or excluded using SNP or STR markers. The alleles in the DNA-profile of the offspring individual(s) must be present in its putative parents with each parent contributing one allele per marker. If alleles occur which do not correspond to the putative parental profiles, they can be excluded. More complex kinship analysis, for example sibling identification, may be achieved with analogous approaches.

For the exclusion of kinship relations, no population data is required. However, the variability of genetic markers is based on heritable (rare) mutation events (see Chapter 12).

The existence of other polyploidy levels demands adaptations to the approach described. Special attention has to be paid to different forms of propagation (see above). If identical (or very similar) genotypes are shared by several individuals, a common genetic origin may be deduced directly. However the exact genesis of the descendants (e.g. offspring being produced by clonal propagation, repeated selfing or apomixes) cannot be reconstructed without further knowledge about the species.

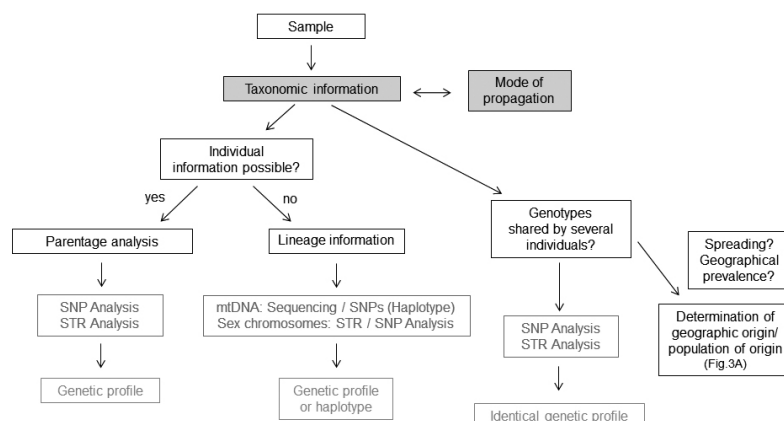


Fig.3B: Determination of the genetic origin (kinship analysis or breeding lineage) - Where does it come from? Overview of general working stages and possible strategies. The flow diagram shows questions and information necessary for a decision (black), helpful techniques (red) and data generated (green). Important information is shaded grey. The suggested flow of work is indicated by arrows, however this is not obligatory.

In the absence of one or both parents, or if descendants have to be retraced over several generations, the analysis of a breeding lineage may be more convenient than an STR or SNP approach. Lineage analysis may be conducted by sequence analysis or SNP analysis of the entire mtDNA or its hypervariable (control) region (D-Loop) in animals. Due to its uniparental (mostly maternal) heritage, the resulting haplotype should be matrilineal passed over generations unaltered or only slightly altered. The higher robustness and amount of mtDNA compared to nuclear DNA can be advantageous for forensic applications because it may enable the investigation of less well-preserved tissues (e.g. degraded bone material) if no other material is available.

Markers residing in the non-recombining regions of sex chromosomes, such as mammalian Y-chromosomes, enable ancestral tracking through males. Z-chromosomes in birds and amphibians are inherited uniparentally and may also be used for lineage analysis in some species. For these regions of the nuclear genome, STR or SNP analysis is applied and leads to a haploid profile. Due to duplications and translocations more than one allele may be observed for some marker loci. These markers are located in non-recombining regions and are consequently inherited as a complete haplotype. This should be considered when estimating the statistical significance of these markers (see Chapter 12).

Determination of other groups of individuals within a species

The identification of certain groups of individuals within a species may also address functional properties, for example plant cultivars or animal subspecies revealing a certain phenotype or producing certain active components (e.g. pathogenic microbial strains or the THC/CBD chemotype in *Cannabis*). Generally, group-specific mutations or genes in the nuclear genome are detected by selective PCR or sequencing the characteristic region.

A single site or multiple sites (e.g. a gene responsible for a monogenic trait, a specific transgene, a group of toxin genes) harbouring mutations can be targeted. Genetic variation in

these loci should be linked either genetically to the trait of interest (pathogenicity, chemotype) or their functionality should have been authenticated independently. Group-specific identification also comprises sex determination in dioecious, sexually propagating species. Male and female individuals can be determined by targeting polymorphic markers in sex determining regions or closely linked to such.

Complex traits are most often multigenic and markers linked to the phenotype allow only statistical predictions. In this case a reliable statistical fundament is necessary for a forensic application.

Determination of the composition of a population of microorganisms: Microbiome analysis

The composition of taxa represented in a community of microorganisms allows a sample to be assigned to an environmental source if it is stable and distinctive. Due to its large microbial diversity and the influence of various biotic and abiotic factors, provenance-dependent microbial DNA profiles can be used to determine the origin of non-human cell material found on the human body, for example on the skin or in the digestive system, or the geographic origins of soil traces.

Direct DNA-extraction and subsequent PCR-based techniques from these bacterial populations are available, therefore the microbial diversity can be visualized without the loss of non-culturable species. The visualization of abundant and less abundant species within the community makes this method very sensitive to cut off values and diluting effects.

The method of extraction is important, as some bacteria (e.g. Gram positive bacteria) and spores are hard to lyse, or contained within a rigid matrix such as instant soil. Methods with stringent lysing steps, for example bead-beating, are very suitable for extracting DNA from cells which are difficult to lyse or those within rigid matrices. The choice of extraction method will influence the final DNA-profile of the microbial population.

For most downstream analyses the amount of input DNA needs to be quantified as different matrices can result in a broad range of bacterial DNA-concentrations and will subsequently influence the final DNA-profile. Certain soil or faecal samples can contain large amounts of bacterial DNA.

The 16S rRNA genes (bacteria) or 18S/23S rRNA genes (fungi) can be used as target loci for community profiling. For more differentiation within faecal *Enterobacteriaceae* the GroEL gene can be used.

The approach may also involve plant and metazoa targets to investigate a broader spectrum of living beings (Giampaoli et al., 2014).

Following PCR, methods to visualize the population typically include digestive techniques, for example terminal restriction fragment length polymorphism (t-RFLP, RISA), hybridization techniques such as microarray analysis or massive parallel sequencing assays (NGS). All techniques have different resolutions and it is important to choose the technique(s) with the desired resolution.

- With t-RFLP/RISA no taxonomic information on the microorganisms present will be generated. Nonetheless, these techniques are suitable to compare samples in order to determine a possible common source. PCR can be performed with one or two labelled primers (depending on the regions amplified one labelled primer may be sufficient). The choice of primer combination and restriction enzyme(s) determines how many restriction fragments will be generated.

- With microarray analysis, taxonomy information becomes available. For some applications commercial microarrays are available, but custom made arrays may also be suitable. 16S rDNA probes can be validated against the Ribosomal Database Project (RDP) database while probes targeting other genes or organisms can be validated using public or private databases.
- Next generation sequencing can give insight into a population at a very high resolution. Amplicon sequencing of the 16S rRNA genes can be used for taxonomic determination to at least genus level, while shotgun sequencing may lead to lower level taxonomic determination. The desired length of the reads depends on the application for which NGS is used; for species identification longer reads can provide more information. Extremely high resolution NGS may not always be necessary for forensic investigations.

5.4. Peer Review

The peer reviewing should be organized by the laboratory quality system. If possible, all critical processes such as the analytical plan of methods applied and the interpretation of data should undergo a peer review by a second practitioner.

All peer review must be documented in the case record.

6. **VALIDATION AND ESTIMATION OF UNCERTAINTY OF MEASUREMENT**

6.1. Validation

Techniques applied in forensic investigations require preliminary validation according to forensic standards, such as ISFG recommendations (Linacre et al., 2011). The method of validation depends on the specific technique and its application. The application of novel markers requires preliminary clarification or determination of their genetic background. The specific genetics of the organism investigated may require different forms of validation. Generally validation can be divided into biological validation (of species markers, STR-systems or SNPs, including their interpretation), technical validation of analytical methods using dedicated equipment and the validation of interpretation. These aspects have been previously documented for the field of non-human DNA-typing by Budowle et al. 2005, Linacre et al. 2011, and the SWGWILD Standards and Guidelines 2012.

6.1.1. Biological validation

Regarding the validation of DNA-markers for certain purposes (taxonomic identification, within species “individualization”, parental analysis), known biological parameters should be evaluated:

- Genetic source of the DNA-marker

The genetic source of a DNA-marker will influence the inheritance, as will be discussed in the next paragraph. However, if the genetic source is a multiple copy locus, length heteroplasmy and nucleotide heteroplasmy can occur. In addition, copies of mtDNA sequences may be present in the nuclear genome. These features may be encountered during validation and can vary between individuals, species and populations, without affecting the applicability of the DNA-marker. However, it should be documented if these types of variance should be expected and the resulting consequences.

- Type of inheritance and propagation (Mendelian, maternal/paternal, clonal, self-pollination, etc.)

The type of inheritance affects the evidential value of the outcomes of the analysis. During validation of the marker, it should be known if inheritance is independent from other markers (loci), and whether it follows Mendelian inheritance or not, due to its location on chloroplasts, mitochondrion or sex-chromosome.

In plants, reproduction by self-pollination, cloning and the inheritance of chloroplasts (maternal in angiosperms, paternal in gymnosperms) can influence the appearance of the marker/allele in the next generation or in the population.

- Biological variation (within a single individual, between individuals within species, between species, between populations)

In order to assess the applicability of a marker for species identification, individualization or parentage testing, it is important to document the behaviour of the marker within the relevant population. Previously published data about the biological variation of the marker should be verified in the population of interest from a forensic point of view.

Markers for species identification should be tested for both the intra-species variation and the inter-species variation (to specify differences with the closest neighbours).

For markers for individualization (STR), the number of alleles, allele frequencies in the relevant population, etc. has to be determined. This includes identifying whether genotype-frequencies are in Hardy-Weinberg-equilibrium, giving insights in factors such as inbreeding, bottle-necks, ecological barriers and the presence of null-alleles.

If STR markers are used for parental testing, attention should be paid to inheritance and mutation rates. In addition, the structure of a repeat and the ability to unambiguously identify alleles should be evaluated.

Repeats of less than three nucleotides, although extensively described in literature, should be avoided since they produce stutter artefacts which are problematic when applied in a forensic setting (e.g. poorly conserved samples, limited trace material).

For biological validation of DNA markers, recommendations published by Linacre et al. 2011 are applicable for animal DNA testing. This includes selection of the appropriate marker, primer-sequences, intra- and interspecies studies for taxonomic typing and published primer-specificity and reproducibility, mutation probabilities for STR-alleles, allele frequencies and kinship factors for identity testing.

When animal DNA-testing is conducted routinely and/or inter-lab-comparisons are required, recommendations regarding the use of tetrameric repeats and allelic ladders can be of use.

Similar criteria are in place for plant typing, although special strategies for reproduction (clonal, self-pollination) must be taken into account.

6.1.2. Technical validation

The technical validation refers to the optimization and standardization of an analytical technique with the chosen reagents, equipment and controls. For technical validation, many criteria and recommendations can be found, for example in the ENFSI-QCC document "Guidelines for the single laboratory Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science" (2014). It should be recognized that some criteria and recommendations are written for quantitative methods. Since DNA-analysis can also be only qualitative, especially when end-point PCR is involved, as for most of the STR-analysis, parental testing and taxon identification, some of the validation parameters particular to quantitative methods are not applicable.

For technical validation, additional field-specific recommendations have been previously documented (Budowle et al. 2005, Linacre et al. 2011, and the SWGWILD Standards and Guidelines).

6.1.3. Validation of interpretation

For species identification, the evaluation of specific markers, base-calling and/or the comparison of sequences should be validated.

For STR-analysis, the identification of alleles, comparison of profiles, assessment of null-alleles, allelic drop-in, allelic drop-out and the production of artefacts should be validated (Gill et al., 1997). For the interpretation of mtDNA typing guidelines have been reported and should be validated for the application to NHBT (Bär et al., 2000).

Mutation events may have occurred in the generation selected for analysis, which may in turn cause inconsistencies at a limited number of loci while all other loci show genetic consistency: therefore not every false allele indicates false parentage but may be due to a (rare) mutation event.

Mutation rates are marker and locus specific and should be assessed by screening pedigree studies: these should then be incorporated into parentage analysis. However this is not often possible for wildlife or rare species, therefore profile interpretation must be undertaken with caution. If mutation rates are not available, a conservative estimate of 10^{-3} mutations per generation has been suggested for STR markers and differences at more than two loci per 10-12 STR markers as a threshold for parental exclusion (Dawnay et al., 2008).

In general it can be stated that when analyses are applied in only a single case or on rarely occurring traces, allelic ladders and standardized nomenclature are not yet required. If results have to be compared with other laboratories or earlier results in databases, these tools are strongly recommended.

6.2. Estimation of uncertainty of measurement

When applying quantitative PCR, the standard deviation of the CT-values should be determined, translated to actual deviation in DNA-concentration and reported. For qualitative methods the estimation of uncertainty of measurement is an integral part of the validation of interpretation process (see 6.1.3). Possible sources of uncertainty arise during sample preparation, DNA extraction, purification, amplification, detection and interpretation.

7. PROFICIENCY TESTING

Proficiency tests should be used to test and assure the quality of the molecular genetic analyses of NHBT in forensics. A list of currently available PT/CE schemes as put together by the QCC is available at the ENFSI Secretariat. "Guidance on the conduct of proficiency tests and collaborative exercises within ENFSI" provides information for the ENFSI Expert Working Groups (EWGs) on how to organise effective proficiency tests (PTs) and collaborative exercises (CEs) for their members.

PT samples could be part of validation experiments and/or harmonization processes between different laboratories applying the same, or different, analytical methods to produce results for a particular forensic examination.

If there are no proficiency tests available for a specific field, the user of the particular analytical

method in question must conduct a blind trial using reference samples to ensure the reliability of the results obtained as part of an internal quality assessment.

Within existing methods, these tests are used to identify potential sources of error, produce corrective measures and optimize the potential for improvement of any quality management system. The quality measures are designed to demonstrate the accuracy and precision of results and the limits of detection of the analytical method tested.

Proficiency testing serves not only to evaluate the chosen method, but also to assess the performance of the laboratory and their ability to reach appropriate conclusions following the application of the analytical method in question. (see also “The GEDNAP proficiency testing system, 2013).

For the examination of samples the laboratories are expected to follow the international guidelines for forensic DNA analyses and to include all necessary controls. For DNA extraction and amplification, adequate controls (e.g. positive, negative and reagent controls) must be processed in parallel. If there are no existing international guidelines for newly adapted methodologies the rules must be defined by the coordinator of the PT/CE or an alternative advisory group.

Laboratories are asked to retain an adequate quantity of the test sample for second opinion testing should there be any disagreement over the identity of the sample or concerns regarding contamination prior to the sample being received by the analyst/investigator.

8. HANDLING ITEMS

The collection, packaging and handling of samples from animals, plants, fungi and soil for molecular analysis requires the same standards as the investigation of any incident. The integrity of the item and the traceability of evidence (i.e. chain of custody) are required to ensure that the developing case is not challenged as a result of improper handling procedures.

It is important to note that this manual is not a guide for crime scene investigations nor for crime scene investigators. General information is available at the Forensic Science Network Scene of Crime Working Group.

8.1. At the scene

Crime scene investigation is a systematic process that aims to record the scene as it is first encountered, recognize and collect all physical evidence which may be relevant to the solution of the case. Preserving the chain of custody is of vital importance to this process. This refers to the careful and chronological documentation of the handling and analysis of evidentiary materials during a case. Throughout the process, it is crucial to be able to demonstrate every single step undertaken to ensure the traceability and continuity of the evidence from the crime scene to the courtroom.

When handling evidence at any stage of an investigation, possible contamination of samples must be avoided. Gloves should be changed when handling different objects to prevent cross contamination between samples. Crime scene investigators have to be particularly aware of non-human biological contamination which can, for example, be introduced by police dogs or pollen in the air.

Personnel working at crime scenes and handling samples may be exposed to various health and safety hazards. These may include chemicals, biological material (e.g. blood and body

fluids), explosives and other risks. Therefore health and safety procedures should remain a priority throughout the process.

8.1.1. Recognition of evidence

For the detection of biological samples (blood, saliva, hair, tissue, bones, plant material, etc.) on tools, clothes, etc. during the crime scene investigation, visual inspection will often be adequate. In some cases the use of special lighting may be required.

Before collecting the samples the presence of other types of forensic evidence, for example, human DNA and fingerprints, must be taken in consideration: care must be taken in preserving these.

8.1.2. Collection of evidence

Whenever possible, stains should not be removed from an object at the crime scene; the object should instead be collected. If the stain is on an immovable object, it should be cut out and removed if possible (e.g. a section of carpet) or collected with a cotton swab manufactured for forensic purposes (e.g. from a solid or fixed floor surface). In these cases, control samples should also be collected to allow the evaluation of the genetic background.

8.1.3. Preservation and packaging

All NHBT should be stored in a cold, dark and dry environment. Living material should be treated according to their specific needs. Moistened stains should be dried as soon as possible or frozen immediately.

Liquid body fluids (blood, saliva, semen, urine) must be stored in specific containers and transported at cool environment. Animal tissues, bones and teeth should be cooled. Plant material may be dried. For longer storage soil samples should be frozen (-20°C).

8.1.4. Transport

The evidence should be transported to the laboratory as soon as possible. Repeated thawing and freezing cycles should be avoided.

8.2. In the laboratory

Identifying information on articles of evidence must be checked on receipt to ensure it is consistent with the submission form.

Stain materials should be collected, identified and analyzed using appropriate DNA-techniques. DNA-analysis techniques are highly sensitive and may be affected by contamination, therefore contamination and carry-over should be avoided throughout the laboratory investigation. In particular, contamination of trace material with reference samples must be avoided by handling these items separately in time and/or space.

Where possible, leave a sufficient quantity of raw sample or extract for a second test or subsequent investigations.

DNA extracts should be stored between -20°C and -80°C for long term storage or at 4°C for a short period of time. Repeated thawing and freezing cycles should be avoided.

9. INITIAL ASSESSMENT

Every condition and action (e.g. interruption of the cooling chain, decomposition, degradation, fermentation, chemical treatment) which may affect the quality and quantity of DNA/RNA within

the trace should be taken into consideration when selecting methods to be used for the analysis and interpretation of results.

10. PRIORITISATION AND SEQUENCE OF EXAMINATIONS

Guidance for establishing priorities and sequences of examinations of NHBT in the laboratory setting are provided in Chapter 5 (Figure 1 – 4).

If morphological or chemical investigation is to be done in addition to PCR based examinations, the risk of contamination must be considered and minimised. Especially chemical pre-treatments/tests or UV-light may cause degradation of target DNA/RNA.

In general, NHBT exhibits are only analysed using molecular methods, not as part of a multidisciplinary investigation. If other bodies of professionals are to analyse the trace evidence, the splitting of samples should be considered in advance.

If the carrier of the traces itself is undergoing multidisciplinary investigation, all relevant experts should determine the most appropriate sequence of examinations as dictated by each individual case.

11. RECONSTRUCTION OF EVENTS

Not applicable

12. EVALUATION AND INTERPRETATION

Recommendations, standards and guidelines on evaluation and interpretation have been described previously for the field of non-human DNA-typing by Budowle et al. 2005, Linacre et al. 2011 and the SWGWILD Standards and Guidelines 2012.

12.1. Evaluation of data

The method of evaluation must be appropriate for the applied analysis. The results have to be derived unambiguously from sequence or/and length matches or differences. The evaluated result must be invariable to analytical conditions.

The analytical data should be evaluated before interpretation. Depending on the analysis performed, the following criteria may be considered:

- Automated base or allele calling should be checked manually and independently by two practitioners where possible. The manual adaptations/mutations should be recorded and stored together with the raw data.
- For sequencing, each position should be base called by at least two reactions, starting from different primers, if possible or applicable.
- For STR analysis, designation of the sample allele is only possible if the largest and smallest alleles for that sample fall within the range covered by the internal size standard.
- The positive and negative controls that were taken through the analytical process should be evaluated. If a control shows deviating results the practitioner should reject the results or consider this during the evaluation/interpretation of the data obtained for all other samples in the same batch. The lab should provide rules for how to handle control results.
- The risk that the obtained analytical result is caused by contamination should be evaluated. The contamination risk is sample type dependent:

- Tissue samples that can be decontaminated (e.g. bone) vs liquid (e.g. blood spot)
- Abundant tissue sample vs. trace samples with low DNA concentration
- Mixtures vs. pure material
- Each laboratory should implement minimum thresholds for the acceptance of data. Examples of data quality indicators include quality scores, signal intensities, peak heights, and background levels.
- When interpreting mixtures, the number of contributors, the genetic background, contamination issues (e.g. the admixture of human DNA) and the technique chosen should be taken into consideration and alternative strategies or methods can be applied if necessary (e.g. the ploidy in plants will affect STR analysis, while the primers chosen may influence the ratio of the signals in Sanger-sequencing and multiplex reactions).
- Be aware of the presence of heteroplasmy in multiple copy loci (e.g. mtDNA). Criteria for the detection of heteroplasmy should be stated (e.g. noise to signal ratio). The tissue type of the analysed sample and the heteroplasmy rate in the studied sequence has to be considered: always be conservative in the data interpretation as heteroplasmy may be present in the sample but below the detection limit of the used technique.
- In case of mtDNA analysis, the (co-)amplification of a nuclear pseudogene must be considered.

12.2. Interpretation of data

The interpretation of data obtained from non-human biological samples in forensic casework is discussed with reference to the three main forensic questions, as stated in Chapter 5: (i) what is it? (ii) to whom or what does it belong to? and (iii) where does it come from?

Multiple factors can make the interpretation of non-human DNA data challenging: a wide variety of species could be encountered during case work, multiple sources of DNA can be analysed and many different analytical techniques could be used.

Some species/populations have not been extensively studied and are not often investigated in forensic cases. The interpretation of DNA data from such specimens cannot rely on reference data to gain insight into phenomena such as genetic sub-structuring of a population, mutation rate of genetic markers, etc. The lack of genetic reference data therefore has an influence on the interpretation of the data: conclusions should be drawn on a case by case basis, and carefully detailed in the report.

During interpretation, the use of DNA data from reference samples or forensic databases is recommended if available. Special attention should be given to the pre-evaluation of open source databases, since biased or false data can negatively influence interpretation. Taxonomic classification, individualization and population assignment require dedicated databases which describe the relevant population and the variation within this population. Additional specific database requirements will be discussed for each application.

The availability of frequency data enables the statistical interpretation of results using likelihood ratios (LR) following Bayes Theorem. The frequency data must be supported by a representative reference population. In the absence of relevant data the nominal statistics cannot be provided and an estimated category of probability should instead be considered.

The interpretation of DNA data from biological traces in a forensic investigation may also require

ecological expertise regarding the particular species under investigation. The interpretation may therefore be a combination of both genetic and non-genetic data. The interaction between these two types of data is not within the scope of this BPM.

(i) What is it? Taxon identification

A sample will be assigned to a certain taxonomic level, while excluding all other species, genera and families. The taxonomic level achieved for the identification should be stated.

It is important to note that the concept of a species is not clearly defined.

Taxonomic classification based on DNA sequences compares the DNA sequences obtained from the samples with reference DNA sequences.

Locus/loci

The choice of locus/loci is level and taxon dependent and should be evaluated for each case. If the practitioner has no experience with the questioned taxon, they should consult scientific literature to study the taxonomy or contact an external expert in the relevant scientific field to determine the most appropriate locus/loci.

The locus/loci should enable the identification of the unknown taxon among those that are close genetic relatives. To achieve this, the evolutionary relationships of the taxons in question should be considered (e.g. a faster evolving gene would be recommended for groups that diverged relatively recently from a common ancestor).

The primers selected may be universal or more specific, depending on the taxonomic level to be determined.

The use of multiple loci should be considered, particularly for those taxons where a single locus is insufficient for classification (e.g. plants). The loci should be evaluated in combination taking into account their individual mutation-rate.

The markers used by the members of the APST are listed in the ENFSI APST Working Group database, held on the APST site of the ENFSI intranet.

Using reference databases

The database selected should contain the taxons under consideration along with species known to be closely related genetically. If not, the limitations of the reference data should be described.

The database should also contain multiple specimens from each of the taxons.

Determining the origin of a trace requires not only relevant population data but also ecological expertise. If necessary, an expert in that particular field should be contacted.

The obtained DNA sequences should be compared to an appropriate reference database by sequence match.

The practitioner should check the intra-species variation for this sequence and the distribution of genetic distances among closest relatives.

The parameters used for a search in a public database should be evaluated per taxon and modified if needed.

As the species (taxon) of origin may not be present in the database, non-matches should be interpreted carefully for species (taxon) attribution. Identification to the taxonomic level can be

evaluated by the construction of a phylogenetic tree that contains the unknown sample and reference sequences from the most appropriate species available. The branches should include a measure of statistical support that is known to be taxonomically robust for the species in question.

The following phenomena may limit taxon delineation and should be considered during interpretation: hybridisation, introgression, homoplasy, cryptic species and nuclear integrants of mitochondrial and plastids DNA sequences (NUMTs). The appearance of pseudogenes should also be considered.

(ii) To whom or to what does it belong? Individualization

The goal of individualization is to match the questioned sample to a known sample using a probabilistic approach.

STR-loci

The STR-loci are tested for genetic linkage, polymorphic content and inheritance in a standard Mendelian manner. To reduce the presence of stutters, tetra-nucleotide repeats are preferred over di-nucleotide repeats. Stutter and heterozygous balance should be recorded.

STR-Allelic ladder

If a complete and comprehensive allelic ladder is available, the observed STR-alleles could be called by repeat numbers and should be recorded as such. This allows comparisons between different analyses, instruments and protocols.

If no allelic ladder is available, the alleles should be recorded in base pairs. The harmonization of the allele calls should be done with reference to known samples.

If a comparison of STR results between laboratories or another analytical system is necessary, a reference sample or an allelic ladder is required as a reference.

SNP

Like STR-loci the SNP's are tested for genetic linkage, polymorphic content and inheritance in a standard Mendelian manner. An allelic ladder is not needed.

The signal intensities of the currently used SNaPshot technique are less correlated to the amount of template DNA than for the STR-technique, which should be considered in the interpretation of sample mixtures.

Population database

A population database is used to estimate the allele frequency in the population which is appropriate for the specimen in question, if available. Rare alleles that are not found in the database should be considered during calculation of match probabilities (Johnson et al., 2014).

A population study would not be feasible where the specimen in question belongs to an endangered and protected species.

It is recommended that a database with sufficient variability is used: it should contain specimens that are expected not to be directly genetically related. If not, more loci or specimens should be added. The number of individuals in the consulted database should be indicated.

Interpretation for individualisation

The minimum number of DNA donors in the sample should be evaluated.

Consideration should be given to the observed versus the expected heterozygosity for each marker.

The possibility of stutter peaks, -A peaks, pull-up peaks, spikes, primer mismatches, and allelic drop out or drop in should also be considered.

Profiles of the questioned specimen should be compared with the known specimen.

In case of a profile match, the statistical support of this match should be calculated using the appropriate allelic database. This requires relevant data about markers and populations (frequency, distribution, variance, substructure, relatedness and linkage).

If required, the likelihood statistics can be expressed using Bayes' Theorem. The calculation of LR can be corrected using different factors (e.g. a kinship factor or theta value for inbreeding effects) if co-ancestry and/or population sub-structuring are present, if appropriate population data is available (Johnson et al., 2014). For domestic animals, breeding is controlled or influenced by humans, which ultimately results in inbreeding. Wildlife animals have 'at random' breeding, unless they are rare or geographically isolated, although the genetic variability of wildlife could also be (partially) human influenced (e.g. re-introduction of species in a habitat). It should be noted that there is not always a strict separation between domestic and wild animals (e.g. introgression of wild and domestic cats, dogs and pigs).

All limitations (e.g. unusual inheritance, mating behaviour, representativeness) of suboptimal relevant genetic data must be recorded transparently.

Mismatch with more than one allele must generally be evaluated as exclusion (i.e. the sample and reference are not from same individual).

(iii) Where does it come from? – Geographical or genealogical origin

Geographical origin: the association of a particular sample with a specific population from a known location, while excluding it from other populations

The assignment of a sample to a particular population can be based on species identification or on the variation of the selected marker allele frequencies among populations.

The DNA sequence or STR-profile originating from the questioned sample should be compared to data sets of known populations.

mtDNA

The Genetic distance between sample and population reference should be calculated from the degree of sequence similarities and is often displayed as a tree (for mtDNA coding region) or network (for mtDNA control region).

nuclear DNA

Sample assignment to a population by nuclear DNA markers could be based on the presence/absence of fixed alleles or on the allele frequencies.

The candidate populations should be defined prior to analysis, and if not, the presence of population substructures in the reference data should be evaluated by a clustering test.

The consulted database should be representative for the considered geographic areas/

populations and should contain sufficient data, depending on the marker type used (SNP, STR) and its location (e.g. sex chromosome).

If the candidate populations can be distinguished by particular sequences or alleles the sample profile should be assessed on the presence or absence of these sequences/alleles.

If the population assignment relies on the allele frequencies, the probability that a sample profile belongs to a particular population should be calculated for each candidate population. The obtained probabilities should then be compared to each other.

If the populations of the particular species are genetically well characterized, different scenarios could be considered:

- (1) If each individual reveals a different genotype, they can be identified and the population and geographical origin become known automatically.
- (2) If a certain genotype is shared by various individuals their mobility and/or mode of dispersal (e.g. by roots, wind, animals, human breeders or trade activities) and their resulting population specificity and geographical prevalence must be taken into account.
- (3) If individuals sharing the same genotype occupy large areas (e.g. plant species) - the geographical localization of a matching sample may not be well defined. For example, clonal *Cannabis sativa* (hemp) cuttings may be propagated on an industrial scale and distributed to various locations across Europe. Where individuals with identical genotypes are discovered in different geographical locations, this does not necessarily indicate a direct connection between the different plantations, this could instead be a common genetic origin. However, trade activities and routes may be retraced by such discoveries.
- (4) If identical or closely related genotypes are shared by individuals from a limited local area (for example, in inbreeding plant species), or where occasional crossbreeding events introduce new genotypes in a certain location, a sufficient degree of genetic differentiation may be achieved to determine the population of origin (and probably also the geographical localization) (Koopmann et al., 2012).

For population assignment or the determination of the geographical origin of a specimen, the biogeographical data of the species in question should be considered. This includes natural habitats, territories, movement of males and females, and the human influences on the species, such as migration (instigated by human activities), breeding programs and re-introduction programs.

Determination of a genealogical origin (kinship or breeding lineage analysis)

Kinship analysis (Paternity testing by SNP or STR markers):

When dealing with species propagating by sexual reproduction, the profile of the questioned specimen should be compared with the pedigree.

When a match occurs, the statistical support can be calculated if an appropriate allelic database is available.

To exclude a kinship relationship, no population data is required. However, not every false allele indicates a false parentage as this may be due to a (rare) mutation event. Mutation rates are marker and locus specific, and ideally, should be assessed by screening pedigree databases

and then incorporated results into parentage analyses. However this is rarely possible for wildlife or rare species, therefore profile interpretation requires cautious interpretation. If mutation rates are not available, a conservative estimate of 10^{-3} mutations per generation has been suggested for STR markers (see Chapter 6.1.3).

Breeding lineage analysis:

Genetic markers located in non-recombining regions, which are consequently inherited as a complete haplotype, should be compared between the questioned sample and known specimens. This should be considered when interpreting the data.

To confirm a match, a population database is required. The random match probability of the questioned sample profile in the considered population can be estimated by verifying the frequency of this haplotype in an appropriate reference database.

The size of the database influences the final result and should therefore be mentioned.

A database for frequency estimations in a population requires a particular method of sampling, preferably at random and covering the whole considered population. Reference databases collected for studying genetic variety in a particular population do not always meet these criteria, and should hence be utilised with caution.

A non-match results in an exclusion. However, the phenomenon of heteroplasmy in mtDNA and the site specific variation rates of the haplotype markers should always be considered in the interpretation.

Determination of other groups of individuals within a species

The appearance of the characteristic marker signal or sequence allows the affiliation of the sample to a particular group of origin and excludes it from all other groups. However if a single locus is investigated, mutations in this locus must be taken into consideration (e.g. for sex markers). Group affiliation can be confirmed by complementing or additional markers/loci. The existence of man-made modifications (e.g. by transgenes, knock-outs or breeding effects) should be considered, depending on the species investigated. Also naturally occurring phenomena like dioecious plants or hermaphrodite flowers have to be considered in sex determination.

Further knowledge about the background and peculiarities of the species may be necessary.

Microbiome analysis - Determination of the composition of a population of microorganisms

The final construction of a bacterial profile is very sensitive to the extraction method, applied PCR and subsequent applied software (including cut-off values and normalization) during data collection.

When a profile is generated, it may consist of data points which correspond with known specimens (analysed by NGS, microarrays) or with unknown specimens (analysed by tRFLP, RISA). It may in some cases be possible to assign a population to a certain origin (geographical or niche) using information at genus or species level without further processing. In many cases however, comparisons should be made with reference samples (databases). Generally this can only be achieved when the same methods have been applied to the questioned samples and reference samples. To make comparisons, an objective measure for the similarity between the bacterial profiles is required as an exact match will never be achieved due to biological and

technical variation and sampling effects. For this purpose, ecological distance measures (e.g. Bray Curtis) or other correlation coefficients can be used to express the similarity between samples (Quaack and Kuiper, 2011). Choosing an appropriate method depends on the dataset and the chosen data processing tools. This should be accompanied with a decision model to define which similarities must be present in samples to be considered to have the same origin (match) or not (mismatch), or when data is inconclusive. This can typically be achieved by building a database with known samples and plotting the acquired coefficients between samples from the same origin together with acquired coefficients between samples from different origins. In addition, the evidential value of such a match should be addressed by both showing high similarity (match) with the appointed origin (the grave for soil) in contrast to low similarity (mismatch) with alternative origins (backyard for soil).

13. PRESENTATION OF EVIDENCE

The overriding duty of those providing expert testimony is to the court and to the administration of justice. As such, evidence should be provided with honesty, integrity, objectivity and impartiality.

Evidence can be presented to the court either orally or in writing. Only information which is supported by the examinations carried out should be presented. Presentation of evidence should clearly state the results of any evaluation and interpretation of the examination. Written reports should include all the relevant information in a clear, concise, structured and unambiguous manner as required by the relevant legal process. Written reports must be peer reviewed.

Expert witnesses should resist responding to questions that take them outside their field of expertise unless specifically directed by the court, and even then a declaration as to the limitations of their expertise should be made.

In general, the report contains the aim of the analysis, the methodology of analysis, the description of samples, the analytical results, the evaluation and the interpretation. If necessary, the limitations of sampling, methods and interpretation should be mentioned.

Independent from the methodology used, the reporting of the exact indication of the analysed genetic marker(s) could be a limitation in non-human DNA casework.

A standard reference sequence and an international nomenclature of STR-loci are not available for all species. In addition, the applied assays are not always published and reference to a publically available document may not be possible. As a result, the genetic markers that were analysed should be given in a general way (e.g. the sequenced gene, the number of loci), while more unambiguous details should be made available on request.

If a consultable publication is available, a reference sequence is internationally accepted (e.g. Kim sequence for dog mtDNA) or an international known reference sequence fragment (e.g. COI-gene fragment for CBOL) is analysed, this could be used as reference.

Each report has to conform to the general guidelines as mentioned above, however there are further issues which are particular to each of the three questions formulated in Chapter 5.

(i) What is it? Taxon identification

To answer this question in a scientifically correct manner it is important to state in the aim of the analysis the level of the taxonomic evaluation: i.e. (sub)species, (sub)genus or (sub)family. The

scientific name of the taxon must always be given in the report. However, if the taxon also has a commonly accepted popular name, this may be included alongside the scientific name to make the report more comprehensible for a non-expert.

The evaluation of the taxonomic classification can result in an inclusion if the specimen in question belongs to the taxon. If the specimen in question does not belong to the taxon, this will result in an exclusion.

If taxons cannot be distinguished by the locus used, this should be reported.

The consulted databases, their versions and their origin (internal and /or international) should be mentioned in the report. Also the time of consultation should be annotated as the content of databases is in a constant state of revision as data is added and removed over time. These modifications may influence the interpretation, and so variation in interpretation could also change with these revisions.

If a database was published and remains unchanged over time, references should be made to the appropriate scientific publication.

The interpretation of taxon identification could be influenced by the completeness of the consulted database. Paucities in the consulted database or phylogenetic tree should be mentioned. The effects of these deficiencies on the uncertainty of the interpretation should be stated.

If other scientific disciplines beyond DNA analysis were involved in the decision process of taxon identification, this should be clarified in the report. It could be useful to refer to a publication or external expert consulted.

(ii) To whom or to what does it belong? Individualization

STR-allele calling can be given as a number of repeats if an allelic ladder is available, or otherwise as a number of base pairs. If a comparison with other reports is necessary, the analysed reference sample or the allelic ladder used should be reported.

The individualisation can be considered an exclusion if there is no match between the questioned profile and the known profile. This is applicable for both haplotype sequences and nuclear DNA STR or SNP profiles.

In the event of match, and if an appropriate genotype database is available, the matching probability should be based on a LR calculation. For haplotyping, an alternative the number of hits of the particular sample sequence in a population database should be recorded.

The date and the version and size of the consulted database should be reported or referred to, since the interpretation could vary depending on the profiles present in the database.

The number of individuals in the database should be mentioned, in particular for haplotype interpretation as the frequency estimation for interpretation is directly based on the number of matches in the population database rather than the multiplication of frequencies of independent alleles, as for STR or SNP profiles from nuclear DNA.

If the results do not allow any decision to be made, the evaluation is inconclusive. A motivation on how this conclusion was drawn should be given.

Correction factors for kinship and/or inbreeding may also have an influence on the interpretation of results and therefore these should be reported, along with their motivation.

(iii) Where does it come from? Geographical or genealogical origin

Geographical/Population origin

An overview of the subpopulations and geographic areas considered could be stated in the report. If the locus/loci used are not sufficient to discriminate between some of the subpopulations, this has consequences for the interpretation and therefore these limitations in interpretation should be reported.

If statistical calculations were necessary for the interpretation, these should be reported to quantify the confidence of the assignment to a population/geographic origin.

The content of the consulted database should be described, including the geographic coverage and number of samples. Both considerations can have a marked influence on the interpretation of the results. Where gaps in the database limit the assignment of a sample to a certain subpopulation or geographical area, this should be mentioned in the report.

Biogeographical data of the species in question should be mentioned if these were used together with the DNA-analysis results in the interpretation. Reference should be made to any publications or experts consulted.

Genealogical origin

If mutation probabilities of STR alleles or the probability of a mutational event were used in relationship testing, this should be clearly reported.

If a match was found in the breeding lineage analysis an appropriate database should be used for interpretation. The size of this database has a direct influence on the match probability and should be provided. If the database has been published, a reference should be made. For a dynamic database the time of consultation should be mentioned if this is different from the time of reporting.

Inconclusive results should also be explained, for example describing the potential heteroplasmy which could be the source of variation between two generations.

14. HEALTH AND SAFETY

Working with biological traces can pose several health and safety risks for the investigator and can create cross-contamination issues inside laboratories. Some of these risks are specific to certain types of biological material (e.g. animal, plant, fungus), while others are related to laboratory practices in general.

14.1. Risks for humans and the environment

Animals and plants may carry diseases: this must be considered when handling their traces. If these are infectious diseases they may be passed on to other individuals of the same species or, in case of zoonoses, to humans. For zoonoses to spread from animals to humans, direct contact between an infected animal and a human is a necessity, or for a large number of infected animals to be present. Animal disease may also be of danger to humans when the causative agents of a human disease and an animal disease are present in a single reservoir and combine to form a new human pathogen. Also soil samples can carry pathogens. Animal diseases are considered a risk for food safety and human health, therefore many

domestic animals, both livestock and pets, are vaccinated against endemic diseases. This decreases the disease pressure in these animals, thereby decreasing the reservoir in which pathogens may reside. Livestock is generally not vaccinated against non-endemic diseases, but when such diseases are encountered, notification of authorities is mandatory and actions to prevent the spread of disease will be taken. Wild animals are typically infected by endemic diseases residing in soils and water or by contact with diseased livestock. Animal remains encountered in forensic investigations will generally not harbour diseases contagious for humans and good laboratory practices including, but not limited to, wearing appropriate laboratory coats, gloves and safety glasses should sufficiently protect the investigator. The risk of working with such remains cannot be considered higher than when working with human remains. However when an outbreak of any animal disease occurs, specific measures should be taken when investigating the remains of animals susceptible to such a disease (e.g. birds during a bird flu outbreak, goats, sheep or cattle during a Q-fever outbreak). Additional measures including the use of filtered facial masks, laminar flow cabinets etc. should be considered.

Animal remains (like human remains) can also harbour other pathogens, including fungi. The risks posed by such pathogens do not differ between human and animal remains and are minimized by the described good laboratory practices.

Practitioners should be aware that fragments from cultivated plants could be chemically treated. When analyses of DNA are required, laboratory procedures and/or chemicals will be used to degrade cell membranes (e.g. DNA-extraction), bind DNA (e.g. Ethidium bromide colouring) or degrade DNA (e.g. UV treatments, DNase treatment). These procedures and chemicals will also affect the cells/DNA of the operators if the necessary precautions are not in place. The chemicals/procedures most likely to pose health risks for the investigator should be registered and actions to minimize the risks should be documented. All investigators should be familiar with any necessary precautions and follow good laboratory practices as described previously.

If laboratory waste is not disposed of in the correct manner, chemicals may also form an environmental threat and will be in breach of the law. If laboratories handling non-human DNA are part of larger biology or chemistry department, procedures for correct waste disposal may be copied from those departments. Alternatively, a laboratory wide waste management scheme may be in place. Individual laboratories which produce potentially hazardous waste must be aware of how to correctly dispose of this waste in accordance with the applicable local laws.

14.2. Risks for investigations

Contamination of samples by other samples from either the same or different cases is detrimental for a specific case, and also impacts negatively on the reputation of a laboratory and public perception of forensic investigations in general. To minimize the risk of (cross-) contamination potential causes should be identified and actions to minimize these risks should be enacted. For non-human DNA, the major concern is working with varying quantities of DNA: low quantities may be present in traces and pre-PCR samples while high quantities are present in reference samples and post-PCR. In addition to general laboratory cleanliness, separating procedures in time, operator and/or space should always be considered.

15. REFERENCES

QCC-BT-001, Guidance on the conduct of proficiency tests and collaborative exercises within ENFSI, version 001, 27/06/2014

QCC-VAL-002, Guidelines for the single laboratory Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science, version 001, 10/11/2014

SWGWILD Standards and Guidelines v. 2.0 (2012).
http://www.wildlifeforensicscience.org/documents/2013/01/swgwild-standards_and_guidelines_2-0_12192012.pdf

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Tully G, Wilson M. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int. J. legal Med.* 113 (2000): 193-196 and *Forensic Sci. Int.* 110 (2000): 79-85.

Budowle B, Garofano P, Hellmann A, Ketchum M, Kanthaswamy S, Parson W, Van Haeringen W, Fain S, Broad T. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J Legal med* 119 (2005): 295-302.

Dawnay N, Ogden R, Thorpe R, Pope L, Dawson D, McEwing R. A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: a framework for developing profiling systems for wildlife species. *FSI Genetics* 2 (2008): 47-53.

Giampaoli S, Berti A, Di Maggio RM, Pilli E, Valentini A, Valeriani F, Gianfranceschi G, Barni F, Ripani L, Romano Spica V. The environmental biological signature; NGS profiling for forensic comparison of soils. *FSI* 240 (2014): 41-47.

Gill P, Sparkes R, Kimpton C. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *For. Sci. Int.* 89(3) (1997): 185-197

Hohof C, Schnöink K, Brinkmann B, Schneider PM. The GEDNAP proficiency testing system, June 2013. <http://www.gednap.org/wp-content/uploads/2013/04/GEDNAP-Manual-E.pdf>

Johnson RN, Wilson-Wilde L, Linacre A. Current and future directions of DNA in wildlife forensic science. *FSI Genetics* 10 (2014): 1-11

Koopmann W, Kuiper I, Klein-Geltink D, Sabatino G, Smulders M. Botanical DNA evidence in criminal cases: Knotgrass (*Polygonum aviculare* L.) as a model species. *FSI Genetics* 6 (2012): 366-374.

Linacre A, Gusmao L, Hecht W, Hellmann A, Mayr W, Parson W, Prinz M, Schneider P, Morling N. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *FSI Genetics* 5 (2011): 501-505.

Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, Van Asch B, Pinto N, Gusmao L, Amorim A. Identification of species by multiplex analysis of variable length sequences. *Nucleic Acid Res.* 38(22) (2010): e203

Tobe S, Linacre A. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* 29 (2008): 340-347.

16. AMENDMENTS AGAINST PREVIOUS VERSION

Not applicable (first version)



**Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for the Forensic
Examination of Non-Human Biological Traces**

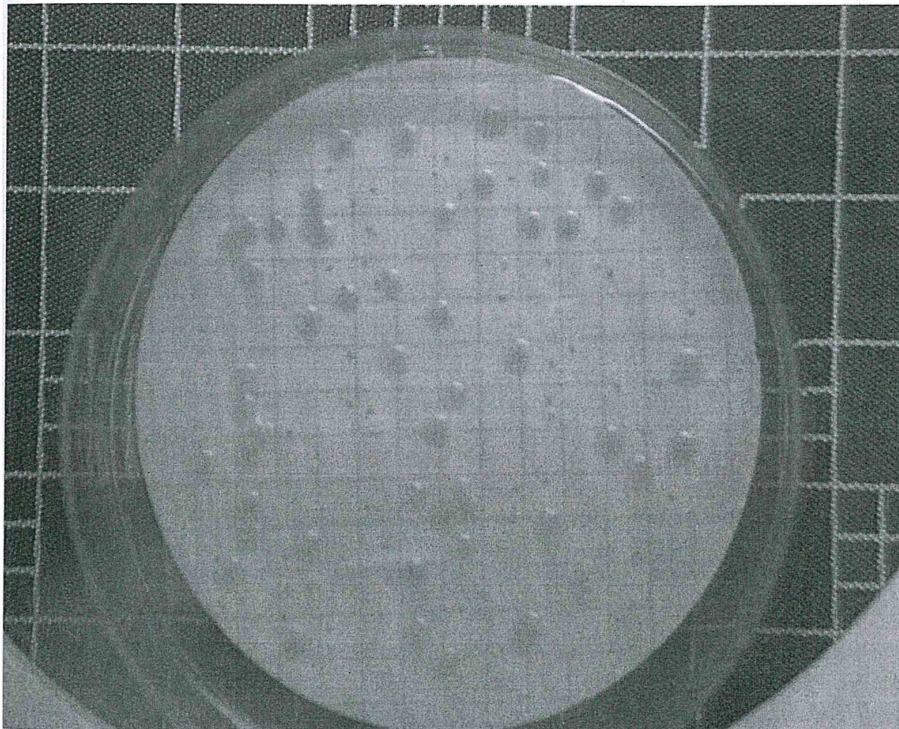
ENFSI-BPM-APS-01

Version 01 - November 2015

PUBLICACIONES

Capítulo I

Análisis criminalístico de suelos (I). La aportación de la microbiología a la prueba pericial



José Carlos Cordero Pérez

1. RESUMEN

El análisis microbiológico de suelos mediante técnicas de genética molecular ha sido propuesto en investigación forense como evidencia para determinar la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen (Horswell, *et al.*, 2002). Aunque se demuestra que dicha técnica es efectiva a la hora de establecer semejanzas y diferencias entre las evidencias que se cotejan, tiene sus limitaciones derivadas de la ubicuidad de algunas especies de microorganismos. El Servicio de Criminalística de la Guardia Civil ha abordado dicho estudio considerando que, con los medios técnicos actuales se puede afrontar la búsqueda de la «aguja en el pajar»: se pueden aislar, identificar y caracterizar, tanto genética como bioquímicamente, las cepas bacterianas que constituyen las comunidades microbianas del suelo, pudiéndose además establecer relaciones comparativas mediante la filogenia molecular.

2. INTRODUCCIÓN

Sir Edmund Locard propuso en 1912 el dogma central de la Criminalística: «Cuando dos objetos entran en contacto, siempre hay transferencia de material. Los métodos de detección pueden no ser lo suficientemente sensibles para demostrar esta transferencia, o la pérdida del material transferido puede desaparecer rápidamente con el tiempo. Sin embargo, la transferencia ha tenido lugar.»

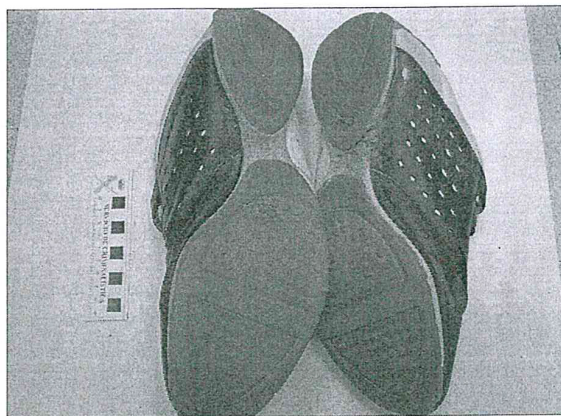
Desde entonces muchos han sido los descubrimientos científicos y los avances tecnológicos que han hecho posible el desarrollo de la Criminalística. A raíz de la psicosis colectiva creada por la amenaza bioterrorista, derivada de los tristemente célebres atentados del 11-S, se priorizó el estudio de la Microbiología como parte integrante de la investigación criminal, si bien el enfoque que se le dio en principio fue el de acotar e identificar

36 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

claramente el o los microorganismos causantes de la amenaza y hacerla frente con eficacia [1].

En el Servicio de Criminalística de la Guardia Civil estudiábamos, como de costumbre, las evidencias obtenidas de los escenarios del crimen, pero pronto comenzamos a plantearnos que, para la evidencia de la que teóricamente era más fácil obtener mayor información, el suelo, no se habían implantado convenientemente metodologías precisas a nivel criminalístico, aunque sí a nivel forense. Muchas ciencias, como la entomología y la palinología, han avanzado para determinar, por ejemplo, la data y el lugar donde se cometió el crimen; determinaciones a todas luces fundamentales para su esclarecimiento.

Pero la gran pregunta que nos formulamos entonces fue: ¿es posible relacionar los restos de suelo obtenido de unos zapatos u otras prendas del sospechoso de un crimen con el suelo donde se halló a la víctima? Evidentemente, como ocurre en criminalística, las preguntas sencillas no suelen tener fáciles respuestas. Es posible demostrar que la transferencia existe cuando encontramos en la muestra de suelo elementos claramente discriminativos (un trozo de cinta aislante utilizado para maniatar a la víctima, pañuelos con restos biológicos de los que es relativamente sencillo obtener ADN, fragmentos de vidrio, escamas de pintura de algún objeto contundente que aparece en el registro de la casa del sospechoso, etc.)



Sin embargo, obviando los elementos discriminativos que pueden aparecer en la muestra de suelo y que, evidentemente, no se descartan en la investigación, ¿pueden dos muestras de suelo por sí mismas, por su propia naturaleza, ser relacionadas? ¿el suelo recogido del escenario del crimen está relacionado con el encontrado en las suelas de los zapatos del sospechoso?

Para responder a estas preguntas efectuamos análisis geoquímicos y botánicos. Dentro de ellos se realizan estudios de textura, granulometría, color, composición química, mineralogía (difracción de rayos-X); morfología, mediante microscopía electrónica de barrido, de minerales así como distintas trazas de vegetales, y un largo etc., los cuales lograban relacionar bastante dos muestras de suelo de la que se nos pedía su análisis comparativo; no obstante, la gran utilidad de estos estudios radica en su poder discriminativo: dos muestras de suelo, aparentemente similares, pueden al final no ser ni parecidas.

2.1. Microbiología Criminalística. Premisas Iniciales

Para completar los estudios que estábamos realizando había que hacer algo más y es entonces cuando nos dimos cuenta de que la Microbiología y, concretamente la Ecología microbiana, podía aplicarse en el estudio de suelos. Incluso elaboramos una definición como hipótesis de partida: «Definimos la Microbiología Criminalística como la aplicación de la metodología científica referida al análisis microbiológico en la resolución de un hecho delictivo». Esta definición se ampara en tres hipótesis:

1. El principio de transferencia es aplicable a los microorganismos.
2. Se ha de disponer de metodología adecuada para caracterizar los microorganismos aislados de las muestras.
3. La comparación entre individuos y/o poblaciones microbianas ha de ser significativa.

Se trata entonces de discernir por qué los organismos están en un sitio dado con ciertas abundancias en un tiempo determinado. Dentro del marco de estudio de la Ecología es importante evaluar la diversidad, abundancia y distribución de los organismos a diferentes escalas que van desde el paisaje, el ecosistema, las comunidades y finalmente las poblaciones de las diversas especies.

A pesar de que la diversidad genómica de los microorganismos en el agua y en el suelo puede ser distinta, el número máximo de individuos que integran el grupo dominante es similar: 104-105 individuos por gramo o mililitro. Este hallazgo sugiere que debe existir algún mecanismo o mecanismos que controlen la densidad de los taxa (especies) y que éstos deben funcionar de manera más o menos similar en todos los ambientes, mientras que los mecanismos que controlan la diversidad total de la comunidad

38 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

bacteriana funcionan de modos distintos en agua y suelo [2]. Existen algunas ideas sobre los mecanismos que controlan la diversidad bacteriana en el suelo:

La complejidad estructural del suelo y los sedimentos es importante para la diversificación a nivel de poblaciones porque esta complejidad permite que los recursos sean fraccionados y de esta manera se creen nuevos nichos con los que se incrementa la especialización y división en especies ecológicas nuevas [2]. Los trabajos de *Alexei Sorokin* y colaboradores [3] indican que las poblaciones estudiadas por ellos de *B. cereus* y *B. thuringiensis* que viven en el mismo suelo son genéticamente distintas y divergentes en mayor grado que las cepas de las mismas especies aisladas de diferentes localizaciones geográficas. Esto sugiere que la **separación ecológica** es probablemente la mayor causa entre separación/cohesión de material genético bacteriano, incluso más que el potencial de estas bacterias para intercambiar material genético entre ellas.

Dos individuos de una misma población local tendrán una probabilidad más grande de estar cercanamente relacionados que dos individuos de diferentes poblaciones. El uso de la frecuencia de las secuencias dentro de la población local, altamente afectada por la historia demográfica reciente de cada población, menospreciará la diversidad nucleotídica como un todo.

En definitiva, la ecología microbiana sienta las bases para su aplicación en el estudio criminalístico de suelos en lo referente a caracterización de las comunidades microbianas, ya que las poblaciones de las diferentes especies que constituyen esas comunidades, como regla general, cumplen las siguientes premisas [4]:

1. Las poblaciones bacterianas están adaptadas a las condiciones bióticas y abióticas locales. Dichas condiciones pueden fluctuar durante las estaciones y mediante severos cambios ambientales.
2. Normalmente ocurre que dichas poblaciones son estables dentro de periodos temporales relativamente pequeños.
3. Sin embargo, nos encontramos con especies de microorganismos que son persistentes durante periodos de tiempo muy elevados y que además son capaces de adaptarse a las fluctuaciones mencionadas. Ésto es debido a que son capaces de crear formas de resistencia latentes (esporas).

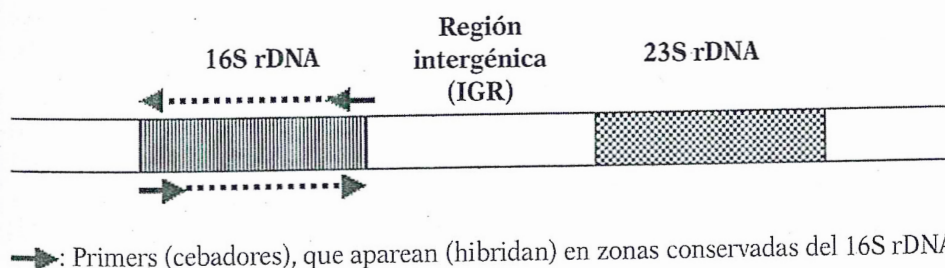
Hemos de entender el suelo donde, por ejemplo, se puede encontrar un cadáver, como el nicho ecológico de una comunidad microbiana caracte-

rística constituida por determinadas especies concretas. Esa era la clave para poder realizar las comparaciones pertinentes entre las diferentes muestras obtenidas en la investigación. Pero, ¿por qué hay tan poca información para los microorganismos? La principal razón es que ver, caracterizar y contar bacterias no es tan fácil como estudiar plantas o mamíferos. Sin embargo, gracias al descubrimiento de diferentes estrategias moleculares que permiten identificar a los microorganismos a partir de su DNA ahora podemos caracterizar bacterias casi tan fácilmente como lo hace un ecólogo de plantas o animales.

El análisis microbiológico de suelos mediante técnicas de genética molecular ha sido propuesto en investigación forense como evidencia para determinar la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen (Horswell, *et al.*, 2002) [5].

Sin embargo, dicho estudio de las comunidades bacterianas que habitan el suelo se realiza utilizando una técnica que permite comparar perfiles genéticos obtenidos, utilizando el rDNA 16S como molécula diana, de modo global (T-RFLP), pero este método tiene relativamente baja resolución, ya que existe cierta probabilidad de que varios filotipos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y representen un solo pico en la distribución y esto puede llevar, nuevamente, a subestimar la riqueza de especies, sin caracterizar a nivel de cepa las especies microbianas que constituyen poblaciones y comunidades estables en los suelos objeto de estudio. Aunque se demuestra que dicha técnica es efectiva a la hora de establecer semejanzas y diferencias entre las evidencias que se cotejan, tiene sus limitaciones derivadas de la ubicuidad de algunas especies de microorganismos

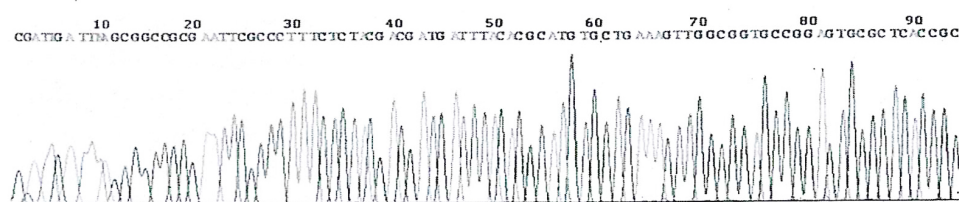
La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.



40 *Análisis criminalístico de suelos (I)***2.2. Características Relevantes del ARNr 16S para su utilización como herramienta identificativa y comparativa**

1. Los trabajos de *Carl Woese* [6] reflejan que se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una *diana universal* para su identificación. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios.
2. «*Las mutaciones en esta secuencia de bases altamente conservada suelen ser letales y los microorganismos con estas mutaciones no sobreviven ni se propagan. Además, como estas moléculas son una parte integral de un complejo, es decir, de la estructura que contiene la proteína (el ribosoma bacteriano), la transferencia horizontal de los rRNA a otros organismos es rara*». [7]

El análisis de la secuencia de los rRNA 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan *Oligonucleótidos firma* [8]. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (especie). Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los rDNA 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. [9].



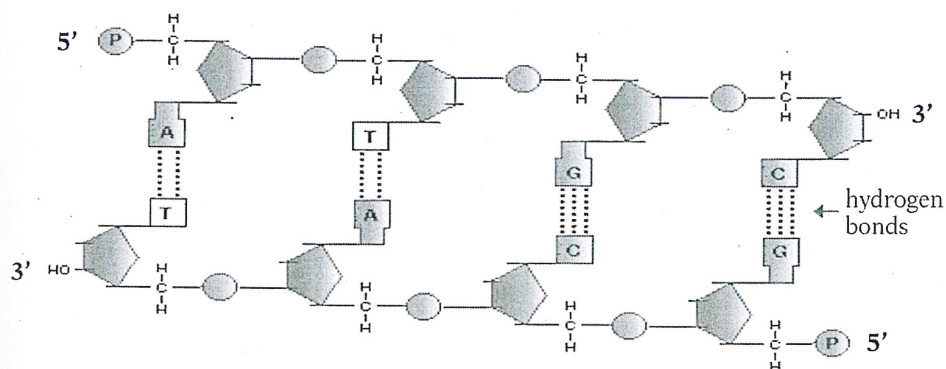
No obstante, en la práctica, la secuenciación del rRNA 16S es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas (arriba del nivel de género). Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

Material y métodos. Ejemplo práctico de aplicación en casos reales: Homicidio 41

Por lo tanto, la caracterización filogenética de los organismos es más que un ejercicio de taxonomía, puesto que las relaciones evolutivas están establecidas en una forma creíble y cuantitativa. Se espera que los organismos cercanamente relacionados sean similares en sus propiedades bioquímicas generales; por el contrario, la diversidad en las secuencias de rRNA indica diferencias bioquímicas potenciales.

La utilización de diferentes técnicas moleculares basadas en el rRNA 16S ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general y del suelo en particular. Hoy en día ya se dispone de completísimas bases de datos, para poder efectuar las identificaciones y comparaciones entre secuencias genéticas.

Pero volviendo a la pregunta ¿el suelo recogido del escenario del crimen está relacionado con el encontrado en las suelas de los zapatos del sospechoso? Pasaremos a describir la metodología empleada en un caso real y que fue la piedra angular de la línea de investigación que seguimos actualmente, que estamos perfeccionando y que no dudamos pueda aplicarse en multitud de cuestiones de interés policial



Representación clásica del DNA

3. MATERIAL Y MÉTODOS. EJEMPLO PRÁCTICO DE APLICACIÓN EN CASOS REALES: HOMICIDIO

Descripción

En un caso de asesinato, ocurrido en una población cercana a Castellón, fueron remitidas al Servicio de Criminalística de la Guardia Civil las muestras relacionadas con la investigación, a diferentes intervalos tempo-

42 Análisis criminalístico de suelos (I)

rales, lo que motivó la confección de cuatro informes periciales. Lo interesante del caso es que su estudio nos permitió implantar una técnica nueva en el laboratorio, basada en la comparativa de secuencias genéticas, obtenidas a partir de bacterias, en las diferentes muestras procesadas.

Muestras

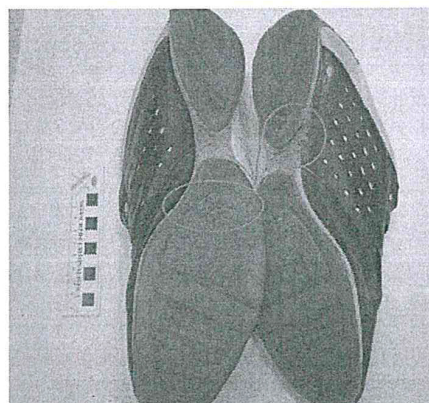
En el primer informe pericial nos remitieron restos de suelo obtenidos de una habitación de la casa del sospechoso del crimen (Muestra 001). En el segundo informe nos remitieron tierra del lugar donde encontraron a la víctima del asesinato (Muestra 040) y una muestra control tomada a 50 metros de dicho lugar (Muestra 041). En el tercer informe nos remitieron un par de zapatillas del sospechoso con escasos restos de tierra (Muestra 042). Una vez obtenidos los resultados decidimos realizar un cuarto informe con muestras tomadas en diferentes lugares y distancias respecto a donde se encontró el cadáver. Dichas muestras se describen a continuación:

- Muestra 45: tierra obtenida de un solar adyacente, elevado, a cuarenta y tres metros de distancia respecto a la escena del crimen.
- Muestras 46, 47 y 48: muestras de tierra tomadas alrededor de un pinar próximo al camino que accedía al interior de la población (a 200, 300 y 500 metros de la escena del crimen).
- Muestra 49: muestra de tierra tomada en la ladera de una montaña, fuera del término municipal (2000 metros de distancia respecto a la escena del crimen).

Todas las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas y de forma superficial (a menos de 5 cm de profundidad). En el caso de las zapatillas se efectuó raspado de las suelas con material estéril.

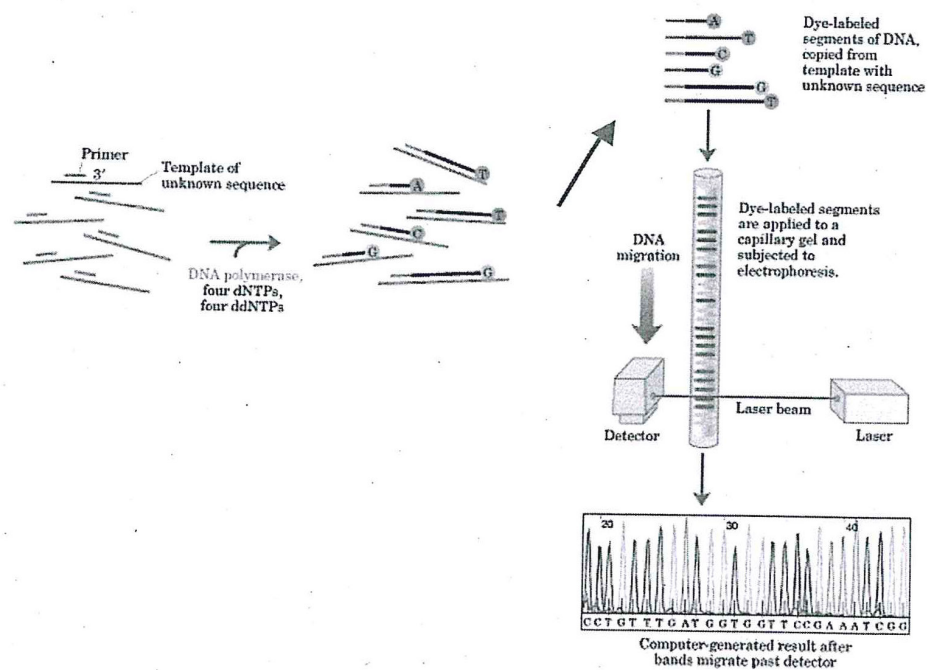
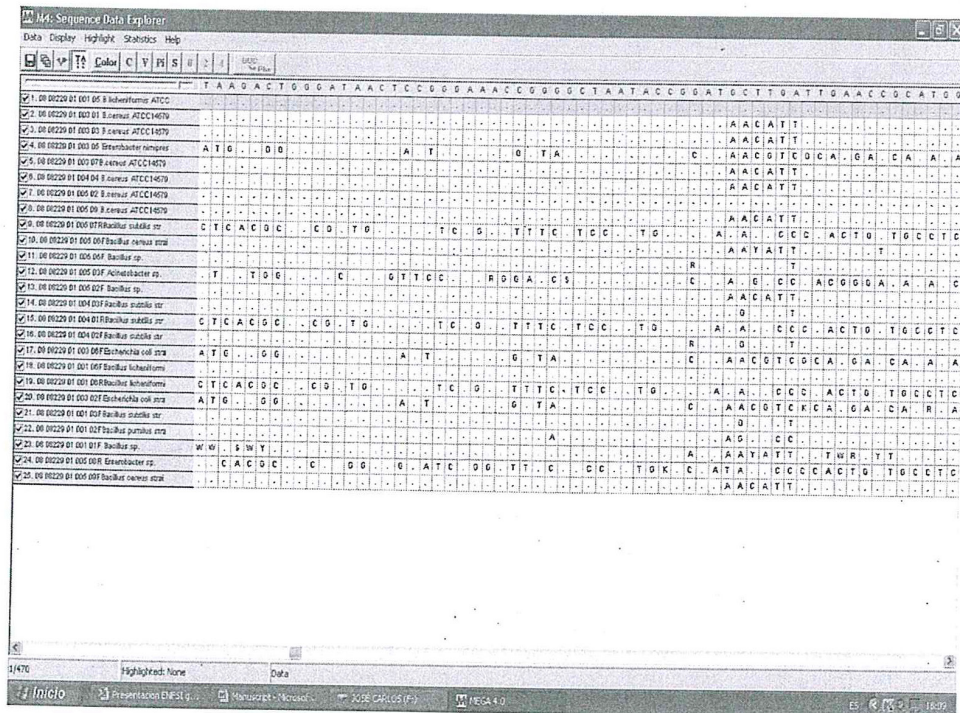
A continuación citaremos el informe resumido que relacionaba las muestras recibidas:

«Hemos utilizado la secuenciación del rDNA 16S como base de la caracterización del parentesco existente entre aislados bacterianos, pertenecientes al género *Bacillus* sp. (Grupo *Bacillus cereus*), procedentes de las colonias bacterianas obtenidas de habitación (Muestra 001/03), zona del cadáver (Muestra 040/02 y 040/06), zona control (a 50 metros de la zona del cadáver) (Muestra 041/05) y de las zapatillas (Muestra 042). Para ello tomamos como referencia los trabajos de Claudio T. Sacchi y colaboradores [10].

Material y métodos. Ejemplo práctico de aplicación en casos reales: Homicidio 43*Muestra 001. Habitación**Muestra 040. Zapatillas
(zonas muestreadas rodeadas de trazo rojo)*

En el estudio realizado se aplicaron las siguientes **técnicas analíticas y métodos** de preparación de muestras:

1. Análisis microbiológico mediante técnica de preenriquecimiento en cultivo no selectivo (peptona salina —Cultimed— 0,1%) incubando 24 horas a 36 ± 2 °C y posterior siembra por extensión de 0,2 ml por placa en medio de cultivo general (Agar nutritivo-Cultimed) incubando otras 24 horas a 36 ± 2 °C para obtención de aislados bacterianos.
2. Diagnóstico de individualización mediante rDNA 16S bacteriano, siguiendo los protocolos de extracción, amplificación y secuenciación del Kit Fast Microseq 500© de la casa comercial Applied Biosystems. El proceso de detección automática se realizó con un secuenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer©. El análisis identificativo de las secuencias obtenidas se efectuó mediante el Software Microseq ID Manager©.
3. Estudio filogenético (parentesco) y comparativo de las secuencias genéticas de los microorganismos identificados para realización de cotejo. Las secuencias genéticas obtenidas de cada cepa fueron alineadas y ensambladas con el Software Microseq ID Manager para obtener así las secuencias consenso de cada una de ellas. Las secuencias consenso fueron comparadas usando el programa MEGA 4.0.1© que utiliza como base de múltiple alineamiento el programa CLUSTAL 1.6© Para el análisis estadístico de parentesco y creación de árboles genealógicos también se utilizó el programa MEGA 4.0.1, además del Microseq ID Manager.

44 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Procedimos a establecer dos grupos (*B. anthracis* y *B. thuringiensis*) que comprendían todas las secuencias genéticas de los especímenes aislados e identificados como tales en las muestras, para así establecer semejanzas y diferencias estadísticamente significativas entre grupos y entre especímenes. El análisis estadístico dio como resultado que ambos grupos establecidos son homogéneos en su comportamiento poblacional, pero el grupo que establecimos de *B. thuringiensis*, a su vez difería del grupo *B. anthracis*:

En la siguiente tabla reflejamos los resultados de **identificación** obtenidos tras el análisis genético del rDNA 16S realizado a diferentes aislados bacterianos **de las zapatillas (Muestra042)**:

Muestra (1)	Identificación
Muestra 042/001	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/003	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/004	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/005	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/006	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/007	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/008	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/009	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/010	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/012	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/013	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/015	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/016	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/017	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/018	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/019	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/020	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/022	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 33679
Muestra 042/023	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/024	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/025	<i>B. anthracis</i>
Muestra 042/026	<i>B. anthracis</i>

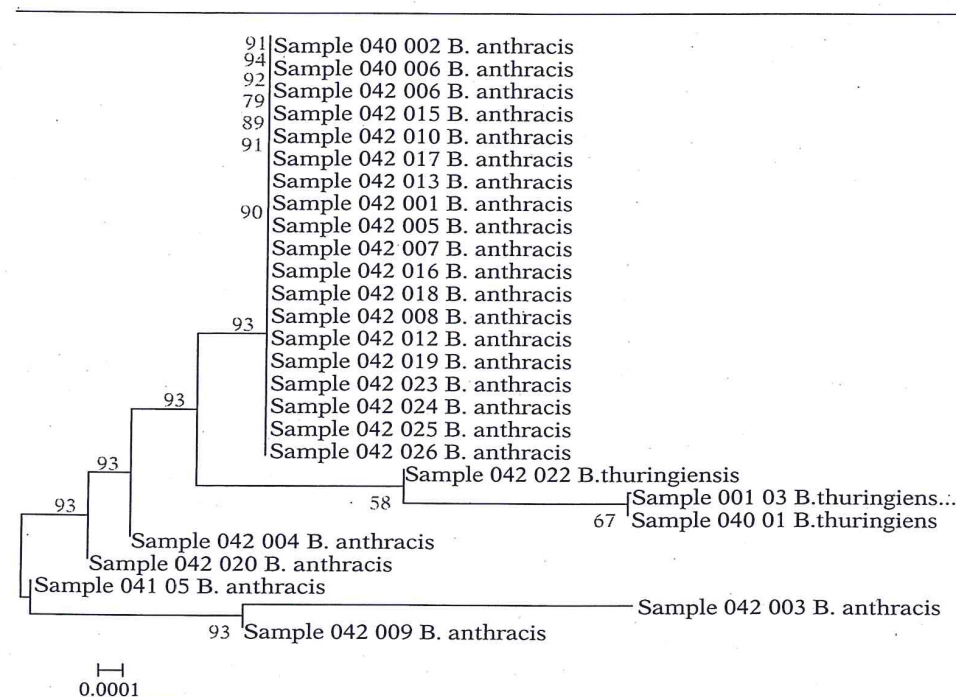
(1) Se reseñan las colonias bacterianas, aisladas de las zapatillas, de las que se obtiene DNA con todos los parámetros de calidad correctos (22 de 26 procesadas).

46 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

Concretamente elegimos *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis*, por ser los especímenes comúnmente aislados en las evidencias estudiadas y hemos de significar que dichos aislados han sido obtenidos, en algunos casos (*B. thuringiensis*) con tres meses de diferencia y un mes de diferencia (*B. anthracis*). Los resultados obtenidos en los diferentes informes relacionados con el caso nos hicieron considerar la posibilidad de que, aunque *B. thuringiensis* y el *B. anthracis* están estrechamente relacionados a nivel genético y presentan un grado de parentesco muy cercano a nivel de especie, los aislados formaran parte de una auténtica comunidad bacteriana con características marcadamente discriminativas, que tuviera como hábitat el suelo donde se encontró el cadáver.

Cuando se estudiaron los aislados bacterianos de las zapatillas y los restos de tierra procedentes de la habitación del sospechoso del crimen, identificamos *B. thuringiensis* (ATCC 33679) en la muestra 001, and *B. thuringiensis* (ATCC 33679) y *B. anthracis* en las muestras 040 y 041.

El análisis filogenético de los 27 especímenes estudiados, reflejó que el *B. thuringiensis* y el *B. anthracis* están estrechamente emparentados, pero conformando una comunidad donde es posible discriminar y relacionar entre sí los diferentes especímenes aislados.



Ejemplo práctico de aplicación en un caso real de terrorismo 47

El árbol representado establece de modo resumido las relaciones de parentesco entre los aislados. Por la gran cantidad de secuencias usadas, fueron contruidos árboles con el método de unión de vecinos (Neighbor-Joining, NJ).

Obsérvese que los especímenes de *B. anthracis* (Muestra 040/02 y Muestra 040/06) están estrechamente emparentados con diversos especímenes de *B. anthracis* obtenidos de las zapatillas. Los tres especímenes de *B. thuringiensis* están en la misma rama, pero el análisis estadístico ha significado que el espécimen aislado en la habitación (Muestra 001/03) y el espécimen aislado de la zona del cadáver (Muestra 040/01) están más relacionados y, a pesar de que en este caso los valores de *Bootstrap* son bajos, se llegó a la conclusión de que los especímenes estaban relacionados mediante el estudio detallado de sus secuencias genéticas, observándose SNP's coincidentes en las mismas. Por último, se observa una relación de parentesco entre un aislado (Muestra 041/05) de la zona control (50 metros de la zona del cadáver) y un aislado de las zapatillas (Muestra 042/03).

A la vista de lo anteriormente expuesto se dio por concluido el informe en los términos siguientes:

- Se aísla y detecta una colonia de *Bacillus thuringiensis* procedente de los restos de tierra adheridos a las zapatillas (Muestra 042/022), emparentada con la colonia aislada en la muestra procedente de la habitación (Muestra 001/03) y con la aislada en la zona del cadáver (Muestra 040/01).
- Los especímenes de *B. anthracis* (Muestra 040/02 y Muestra 040/06), aislados de la zona del cadáver, están estrechamente emparentados con diversos especímenes de *B. anthracis* obtenidos de los restos adheridos a las zapatillas.
- Se observa una relación de parentesco entre un aislado (Muestra 041/05) de la zona control (50 metros de la zona del cadáver) y un aislado de las zapatillas (Muestra 042/003).
- Que los diversos especímenes aislados e identificados como *B. thuringiensis* y *B. anthracis* conforman una comunidad microbiana característica, presente en el suelo donde se halló el cadáver y a 50 metros de éste.

5. EJEMPLO PRÁCTICO DE APLICACIÓN EN UN CASO REAL DE TERRORISMO

Vamos a describir un caso real (ya juzgado), pero en el que por razones obvias hemos inventado lugares, relaciones y denominación de muestras.

48 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

Dimanantes de Unidades de la Guardia Civil implicadas en la lucha antiterrorista se remitieron al Laboratorio unas evidencias para su estudio en relación con expediente abierto por la Audiencia Nacional de Madrid, relacionado con una investigación de hechos relacionados con dichas actividades terroristas.

A modo de resumen: se nos pidió el cotejo entre restos de tierra adheridos a una pala de madera, encontrada en un domicilio de uno de los terroristas investigados, y otras muestras de tierra (procedente de distintos zulos y buzones utilizados por los terroristas.)

En este caso había que tener en cuenta que la pala de madera podía haber sido utilizada para realizar distintos zulos, por lo que la transferencia de material mineralógico podía perderse (como efectivamente comprobamos al observar el utensilio de madera) por la fuerza mecánica en la excavación de dichos zulos. A pesar de dicha pérdida de material, sabemos que se produce transferencia entre las especies microbianas presentes en los distintos suelos y el material adherido a la pala. Por lo tanto, había que demostrarla.

En este caso se efectuó análisis geoquímico a la tierra procedente de los zulos, pero como el material adherido a la pala de madera era, a todas luces, insuficiente para un cotejo concluyente, decidimos realizar el estudio genético bacteriano (obviamos la metodología empleada, al ser ya descrita en apartado 2).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

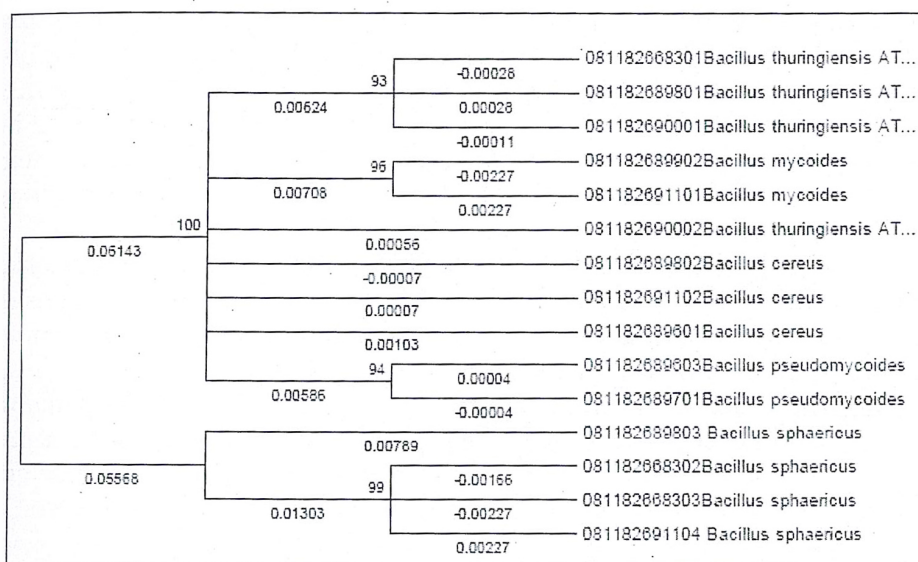
Muestra (1)	Identificación
683	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ; <i>Bacillus sphaericus</i> ; <i>Citrobacter youngae</i>
896	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Acinetobacter genomospecies</i> 14 ; <i>Bacillus pseudomycooides</i>
897	<i>Bacillus pseudomycooides</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp. ; <i>Achromobacter</i> sp.
898	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ; <i>Bacillus sphaericus</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Pseudomonas monteillii</i>
899	<i>Bacillus mycooides</i> ; <i>Serratia quinivorans</i> ; <i>Bacillus pycnus</i>
900	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ; <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC3367 ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>
901	<i>Stenotrophomonas</i> sp.

Ejemplo práctico de aplicación en un caso real de terrorismo 49

Muestra (1)	Identificación
911	Bacillus mycoides; Bacillus cereus; Pseudomonas asplenii; Bacillus sphaericus
912	<i>Raoultella ornithinolytica; Pseudomonas alcaligenes;</i> <i>Citrobacter freundii</i>

(1) Se resaltan en negrita las identificaciones coincidentes (esto no indica que la coincidencia se produzca a nivel de poblaciones y comunidades bacterianas)

El resultado del análisis filogenético fue el que se muestra en la figura siguiente (inventamos e intercambiamos las numeraciones de muestra):



Árbol filogenético basado en análisis estadístico de las secuencias de rDNA 16S bacteriano procedentes de identificaciones coincidentes (NJ (MCL)- PWD bootstrap 1000)

Y las conclusiones fueron las siguientes, pudiéndose realmente determinar la relación entre la pala de madera y los suelos procedentes de los zulos:

- Los aislados bacterianos, identificados como *Bacillus thuringiensis* ATCC10792 y obtenidos de las evidencias 683,.../898 y.../900 están estrechamente relacionados a nivel de población y/o comunidad microbiana (podemos afirmar que los obtenidos de 683 y.../898 proceden de la misma cepa) lo cual indica transferencia de material entre la pala y los suelos citados.

50 *Análisis criminalístico de suelos (I)*

- Los aislados bacterianos identificados como *Bacillus sphaericus* y obtenidos de las evidencias 683 y.../911 están estrechamente relacionados a nivel de población y/o comunidad microbiana, (podemos afirmar que proceden de la misma cepa) lo cual indica transferencia de material entre la pala y el suelo citado.

6. CONCLUSIÓN

Con los métodos y avances tecnológicos actuales, hemos de considerar a la Microbiología como ciencia aplicable a la investigación Criminalística. En aras de una mejor caracterización de las evidencias y, por ende, una mayor contribución al peso de la prueba pericial que constituye el Sumario, el Servicio de Criminalística de la Guardia Civil ha abordado dicho estudio considerando que, con los medios técnicos actuales se pueden aislar, identificar y caracterizar, morfológica, genética y bioquímicamente, las cepas bacterianas que constituyen las comunidades microbianas del suelo, pudiéndose además establecer relaciones comparativas mediante la filogenia molecular.

Por todo ello, el estudio criminalístico de suelos debe ser multidisciplinar y en nuestro laboratorio dicho estudio se realiza desde dos puntos de vista, microbiológico y geoquímica (ver parte II), para una mejor caracterización y comparación de las distintas muestras de suelo.

Estamos de acuerdo con las tesis de Sir Edmund Locard, el principio de transferencia siempre tiene lugar, pero hemos de disponer de la metodología adecuada para demostrarlo. Incluso estamos convencidos de que la definición que sugeríamos al principio puede ampliarse en el futuro.

7. REFERENCIAS

- [1] Microbial forensics -«cross-examining pathogens». Craig A. Cummings and David A. Relman. 14 June 2002 vol 296 Science.
- [2] Torsvik, V., Øvreås, L. y Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic Diversity – Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. Science. 296: 1064-1066.
- [3] Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. Sorokin *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, FEB.2006, P. 1569–1578 VOL.72 N° 29.
- [4] Forensic soils comparisons based on bacterial population profiles. F.C.A. Quaack, L. Joosten, and I. Kuiper. Netherlands Forensic Institute.

Referencias 51

- [5] Forensic Comparison of Soils by Bacterial Community DNA Profiling. (J. Horswell et al. Journal of Forensic Sciences 2002;47(2): 350-353.
- [6] Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J 1993; 7: 113-23.
- [7] Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th Ed.
- [8] Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Syst Appl Microbiol 1985;6:143-51.
- [9] M. Rosario, M.C. Mendoza .Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;22 (4):238-45.
- [10] *Claudio T. Sacchi et al.*. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, 2002 Oct -Centres for Disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, USA.

Chapter 4

Forensic Soil Analysis: Case Study of Looting at a Roman-Visigothic Burial Vault

Enrique Santillana, Jose C. Cordero, and Francisco Alamilla

Abstract The Guardia Civil Criminological Service (Spain) recognises the high value of soil evidence in criminal investigations, as well as its strength as forensic evidence in judicial proceedings, due to its capacity to link a crime scene with a suspect. There is an average of 15 cases per year related to the forensic analysis of soils, which is conducted in our laboratory in the course of criminal investigations. One example is the case of looting at a Roman-Visigothic burial vault which took place in Moron de la Frontera (Seville, Spain), where the Guardia Civil Nature Protection Service (SEPRONA) collected samples from the burial site and from the boots and tools found inside the boot of a suspect's vehicle.

This chapter illustrates the methodology used for forensic analysis of soil samples related to the looting of this burial site (colour, particle size distribution, X ray powder diffraction, major and trace element composition, electrical conductivity, pH, anion concentration and comparison of phylogeny of microorganisms). The results were used to identify similarities between soil samples collected from the tools and boots found in the suspect's vehicle and soil samples from the Roman-Visigothic burial vault.

4.1 Introduction

There are a large number of laboratories that perform analyses of soils and other geological materials found on a variety of materials such as shoes, tools and vehicle tyres and undercarriages, etc. for forensic purposes in cases of homicide, rape, robbery and terrorism, etc. These analyses are considered as evidence in police investigations. The wide variability in the distribution and properties of soils and the techniques applied make it possible to characterise and discriminate different soils,

E. Santillana (✉) • J.C. Cordero • F. Alamilla
Chemistry and Environment Department, Guardia Civil Criminalistic Service,
Guzmán el Bueno 110, 28003 Madrid, Spain
e-mail: eisantillana@guardiacivil.es; jccordero@guardiacivil.es; falamilla@guardiacivil.es

rendering them an important tool in the forensic field. In Spain, there are numerous police laboratories or forensic units that analyse the soil remains found at crime scenes in the course of criminal investigations.

Most of the trace evidence collected for analysis consists primarily of sediments and soil particles, materials which are easily transferred between objects. This geological evidence can be classified into seven groups, which have more or less overlapping boundaries: (1) rocks, (2) sediments, (3) soils, (4) dust, (5) minerals, (6) fossils and (7) particles (Pye 2007).

This paper focuses on comparative analyses of soil, since this is the principal geological material transferred at crime scenes and thus forms the bulk of the material studied in forensic laboratories. Generally, a soil constitutes a complex matrix composed of minerals, organic matter and living and decomposing organisms, and its composition depends on the bedrock, the climate, the organisms present, the topography and the time. From a forensic point of view however, soils are defined according to those elements of a soil which constitute relevant physical evidence in a criminal investigation.

Many different techniques are used in the forensic analysis of soils, all of which have the capacity to characterise a soil sample and compare it with another related to a criminal act. The most frequently employed techniques can be divided into three groups, the first of which concerns the identification of a soil according to its morphological and physical characteristics (e.g., colour, particle size, consistency and so on), as well as determination of the properties of the various minerals present in the soil (for example, particle shape and surface texture). A second group encompasses mineralogical and chemical techniques (for instance, X-ray diffraction, chromatographic and spectroscopic techniques, etc.), whilst the third group involves the analysis of biological traces (e.g., microbiology, pollen, etc.).

It is necessary to employ a comprehensive range of techniques in order to obtain sufficient data for effective characterisation of the samples to compare. Selection of the different analytical techniques to employ mainly depends on the availability of such techniques in the laboratory and their power of discrimination. It is also necessary to take other factors into account, such as sample size, appropriate choice of the fractions (particle size), destructive/non-destructive techniques and the collection of quantitative or qualitative data.

The minimum amount of sample required for analysis is a very important factor that determines selection of the techniques to be used, since in most cases in the forensic field, only a small quantity of soil is recovered from the objects, occasionally limited to just a few milligrams. It is also important to select a suitable particle size in order for the results to be representative and comparable with other soil samples, since although a soil may be mineralogically homogeneous, its chemical composition varies significantly according to particle size and the presence of silica, which is more abundant in the coarser fractions, and trace metals, which are mainly concentrated in fine sand, silt and clay (Pye and Blott 2004). Other factors to consider include the use of non-destructive techniques which will enable further

analyses at a later date, and quantification, which provides comparable numerical data through the use of statistical methods. In most cases where a sufficient amount of sample is available, the preferred method of soil comparison would be based on a combination of methods that combine qualitative and quantitative analyses.

4.2 Case of Looting at A Roman-Visigothic Burial Vault

Looting of archaeological sites is a criminal activity that contributes to the deterioration and destruction of Spain's national heritage and is classified in the Spanish Criminal Code as an offence against Historical Heritage. Although such criminal activities occur throughout Spain, a country rich in archaeological remains, one of the provinces where this type of crime is committed most and where most objects have been seized is Seville. The case study presented in this paper concerns the looting of a Roman-Visigoth burial vault in Moron de la Frontera (Seville, Spain).

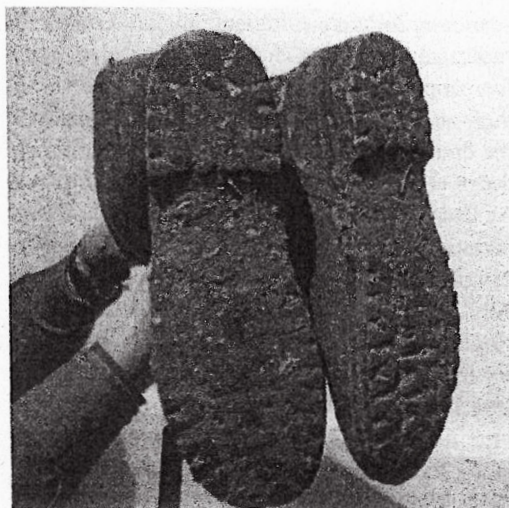
Because the Guardia Civil has jurisdiction over most of the areas where archaeological sites are located, our units conduct numerous investigations into this type of crime. Where the investigations bear fruit and the perpetrators are located, the soil remains adhering to the recovered objects or the digging tools used to plunder the site can be compared. There are three types of looters: occasional ones who enjoy searching for archaeological remains to add to their personal collection and who use rudimentary means. Then there are the people who engage regularly in this activity for economic reasons and who possess technical and material means, and lastly, there are the so-called local scholars, consisting of "archaeology enthusiasts who see themselves as the saviours of local culture but know nothing of modern excavation techniques" (www.guardiacivil.es/patrimonio/activ_princip.jsp).

The Guardia Civil Nature Protection Service (SEPRONA) initiated a police investigation in relation to the looting of a burial vault (Roman-Visigothic) in Moron de la Frontera (Sevilla, Spain). This investigation resulted in the arrest of some suspects who a few days earlier had been prowling around the area where these archaeological remains appeared, and various tools which might have been used to carry out the criminal act were confiscated from the boot of their vehicle. The objects found in the boot included a pair of green boots, a pair of brown boots, a spade, a large mattock and another smaller one, with traces of soil attached. Given the evidence gathered by the Guardia Civil Unit, it was decided to collect soil profile samples at the entrance to the vault which, together with those taken from the vehicle, were sent to the Guardia Civil Criminalistic Service for soil comparison. During sampling of the burial vault, three samples were taken corresponding to one at 120 cm depth, another at 60 cm depth and a last one at surface level (<5 cm depth). The order of sampling was from the bottom up to avoid cross contamination, and samples were collected under sterile conditions (Figs. 4.1 and 4.2).



Fig. 4.1 Roman visigothic burial vault

Fig. 4.2 Green boots
inside the suspect's vehicle



4.3 Methodology

Each of the samples provided sufficient soil to employ a variety of analytical techniques and perform a very thorough comparison, enabling us to determine the similarity or dissimilarity between the evidence and reference samples received in

The first step was to identify exotic materials that could characterise the samples, using stereo-binocular light microscopy. The samples were then dried at room temperature and sample separation was performed for subsequent analysis using two complementary methods. Thus, a subsample of 1 g was taken for microbiological analysis and the remainder was used for geochemical analysis, including the physical and chemical studies required to characterise the samples.

The analytical techniques used to analyse the bulk properties of soils for forensic comparison purposes are as follows: colour, particle size distribution, elemental analysis, major and trace element composition, anion concentration, electrical conductivity, pH, rDNA 16 s sequencing and comparison of microbial communities.

4.3.1 Soil Colour Using the Munsell Soil Colour Charts

The soil property of colour has been applied in forensic investigation and this characteristic is a potentially powerful method for sample discrimination (Pye and Croft 2004). Basically, two identification methods can be used: the Munsell Soil Colour Charts and spectrophotometry.

The different standard colours in the Munsell Soil Colour Charts (Munsell 1994) are expressed through a combination of three parameters: Hue (H), which indicates the relationship to red, yellow, green, blue and purple; Value (V), which indicates lightness; and Chroma (C), which indicates strength. However, this system may be subjective due to differences in colour perception on the part of the observers.

Colour spectrophotometry permits quantification, and thus represents a reproducible technique which is free of the subjectivity inherent in the use of Munsell tables. The spectrophotometers are based on the L^*a^*b colour system, where L represents luminance and a^* and b^* are the chromaticity coordinates.

It should be borne in mind that colour variations depend on particle size, the amount of organic material and the moisture content, and thus various authors have proposed measuring colour after carrying out different treatments (drying, calcination, removal of organic material or oxides) (Sugita and Marumo 1996) and in different fractions. Of the techniques proposed, and that which best discriminates between samples, is measurement of a dry, unsieved sample together with a dried sample sieved to $<150\ \mu\text{m}$ (Croft and Pye 2004; Guedes et al. 2009).

Determination of soil colour was performed using the *Munsell Soil Colour Charts*, which entail a degree of subjectivity due to assessment by the observer; this method was employed because a colour spectrophotometer was not available at the time.

Colour measurements were conducted using two soil fractions. These consisted of dry samples sieved to $<0.5\ \text{mm}$ and $<2\ \mu\text{m}$; the latter corresponding to the sample extracted for analysis of the clay fraction using oriented aggregate mounts for X ray powder diffraction.

4.3.2 *Particle Size Distribution by Laser Granulometry*

Various methods have been used to determine particle size distribution, including direct observation (microscope), image analysis, dry and wet sieving and the hydrometer method, etc. However, the most reproducible of these is laser diffraction, especially in the case of fractions of sand, silt and clay, and the most frequently used fraction is $<150\ \mu\text{m}$ (Pye et al. 2006). To determine the proportion of sand and gravel, it is best to use dry or wet sieving.

Samples were analysed for particle size distribution using a Mastersizer 2000 with a Hydro 2000G liquid dispersion module, employing the Mie model.

In this case, the samples were processed using a $<500\ \mu\text{m}$ size fraction, which provides the highest level of reproducibility, although it was at the expense of limiting the potentially valuable and discriminatory information in the coarser part of the particle size (Blott et al. 2004).

Three subsamples were taken, of approximately 400 mg each, from each of the samples under study, previously sieved and homogenised. These were placed in an Erlenmeyer flask to which we added 50 ml of 2 % sodium hexametaphosphate dispersant solution for 1 h. Water and ultrasound were used as dispersant for 90 s prior to measurement.

To discriminate between samples, we used the following statistical measures: the percentage of sand, silt and clay, mean, median and $D_{10} - D_{90}$ (Blott et al. 2004), in addition to observing the particle size distribution curves of simple and cumulative percentage curves.

4.3.3 *Qualitative Analysis from Bulk and Clay Mineralogy by X-ray Powder Diffraction (XRD)*

X-ray diffraction (XRD) is one of the most important techniques used for identification of crystalline substances, the advantages of which are that it is a non-destructive technique, it can be used to analyse small samples, minimal sample preparation is required, and elements and their oxides can be differentiated, as well as polymorphic forms and mixtures of crystalline substances. Qualitative and quantitative tests can be conducted, and it is thus an extremely valuable tool for soil discrimination (Fitzpatrick et al. 2009).

X-ray diffraction analyses are performed on the unsieved fraction or on different fractions. It can also be used to identify the clay minerals present in the soil. The following groups are found within the clays: (1) the serpentine-kaolinite group (serpentine, chrysotile, kaolinite, dickite and halloysite), (2) the illite-mica group (illite polytypes, mica and glauconite), (3) the chlorite group (chamosite and clinocllore), (4) the smectite group (montmorillonite, nontronite and saponite),

(5) the vermiculite group, (6) interstratified minerals (e.g. illite-smectite, chlorite-smectite, etc.), (7) the sepiolite-palygorskite group, (8) the talc-pyrophyllite group, and (9) the imogolite-allophane group (Pye et al. 2007). The qualitative analysis of clays is performed after examining the changes in the 001 interplanar distances caused by saturation with the alkaline earth elements Mg^{2+} and K^+ and organic compounds solvation (glycerol, ethylene glycol and DMSO). Heat treatment is also necessary to differentiate certain clay minerals, in which there are variations in the basal spacing or disappearance of diffraction lines.

The advantage of quantification by X-ray diffraction is the possibility it provides of statistical analysis and comparison of the results for evidence and reference samples. However, the ideal approach would be a combination of qualitative and quantitative diffraction (Ruffell et al. 2004).

X-ray diffraction analyses (Bruker Advance) were performed on the <2 and <0.5 mm (random powder) fractions. The diffractograms were obtained using a vertical goniometer and scanning from 3 to 70° at 0.05° 2 θ /min. The diffractometer was operated in reflection mode, 40 Kv and 40 mA.

A study was also conducted of the clay fraction (<2 μ), previously extracted by decantation and oriented aggregate mounts. Clays were analysed with respect to modifications in 001 interplanar distances as a result of saturation with the alkaline earth elements Mg^{2+} and K^+ and organic compounds (ethylene glycol), and heat treatment (400–550 °C). Prior to studying the clays, carbonates were eliminated using a 1 N acetic acid/sodium acetate trihydrate buffer at pH=5. The diffractograms were obtained using a vertical goniometer and scanning from 2 to 30° at 0.05° 2 θ /min. The diffractometer was operated in reflection mode, 40 Kv and 40 mA.

4.3.4 *Elemental Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM-EDX)*

Analysis by scanning electron microscopy provides information about the size, shape, surface texture and elemental composition of individual particles, which may be less than 3 μ m in size, in addition to a general analysis of the sample to determine the elemental composition of the minerals present.

This type of analysis does not require a large amount of sample, since a small quantity of fine sand contains hundreds of particles from which hundreds of items of quantitative data can be obtained for comparison. The most suitable fraction which presents least variability is that of <150 μ m (Pye et al. 2007; Pirrie et al. 2009).

In this case, the elemental composition was obtained for the <0.5 mm sample used for X-ray diffraction, which had previously been crushed. The analysis was conducted using an accelerating voltage of 25 Kv, emission current of 60 μ A, 5.10×10^{-6} mbar, area scan at 500X magnification and 10 spot mode analyses taken on an area of 200 μ m².

4.3.5 Major and Trace Element Composition by Inductively Coupled Plasma Spectrometry (ICP-OES)

Major and trace elements were analysed by optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Perkin Elmer Optima 3200 DV device, with an online internal standard (Sc) for calibration and analysis following microwave assisted acid digestion of the samples using the <150 µm fraction, which in most cases is the most suitable fraction for discriminating between samples (Pye and Blott 2004; Pye et al. 2006). Three replicates were performed for each sample, using 100 mg for each one.

Digestion of the soil sample (<150 µm) was performed with ultra trace grade nitric acid, using Milestone Ethos One equipment at 180 °C for 15 min. All material was previously washed with a solution of 0.5 % nitric acid and then rinsed with distilled water.

4.3.6 Anion Concentration by Ion Chromatography (IC)

The concentration in soils of anions such as chlorides, sulphates, nitrates, bicarbonates, phosphates, fluorides and bromides provides data for environmental or land use studies, but can also be used to compare soils in a criminal investigation. In general, the most suitable fraction for routine soil analysis and the one with the greatest power of discrimination is that of <250 µm (Bommarito et al. 2007).

Determination of anions in the soil samples was carried out by ion chromatography (Dionex LC20) after leaching with milli-Q water in a ratio of 1:5, centrifuging at 1500 rpm for 10 min and filtering the supernatant through a 0.20 µm PTFE filter. The mineral fraction used corresponded to <250 µm.

4.3.7 Other Analytical Techniques

Other techniques frequently used for the characterisation of soils which can also be used as comparison parameters include: (1) pH, which indicates the soil type (basic or acidic) and (2) electrical conductivity (EC), which measures the concentration of ions in solution (dissolved salts). Determination of the pH and conductivity of the 1:5 mass/volume extract was conducted in accordance with UNE 77305 and UNE 77308.

4.3.8 *rDNA 16S Sequencing and Comparison of Microbial Communities*

Using samples from soils, boots, the spade and the mattocks, microbiological analyses were performed employing the pre-enriching technique in non-selective culture (peptone saline – Cultimed® – 0.1 %) incubated for 24 h at 36 ± 2 °C and subsequent sowing for extension of 20 µl per plate in general culture media (nutritive agar-Cultimed®) incubated another 24 h at 36 ± 2 °C to obtain bacterial isolates. Individualised diagnosis was performed through bacterial rDNA 16S, in accordance with the extraction, amplification and sequencing protocols established by the Fast Microseq 500 © Kit of Applied Biosystems. An ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer© sequencer was used for automatic detection. Identification of the obtained sequences was carried out with the help of Microseq ID Manager© Software.

Extraction. Each of the different morphotypes obtained from the microbial colonies, isolated in nutritive Agar culture media, was placed in a 1.5 ml centrifuge tube using an inoculation loop, after adding 100 µl of the extraction reagent (*Ultra Prepman* ©-Applied Biosystems). These samples were boiled for 10 min and then centrifuged for 3 min at a speed of 13000 rpm. Subsequently, 5 µl of supernatant was diluted to a final volume of 500 µl (1:100 dilution factor) with previously autoclaved deionised water.

rDNA 16S (500 bp) amplification. 15 µl of the above-mentioned 1:100 dilution plus 15 µl of amplification reagent (FAST Microseq 500®) were taken to obtain a final volume of 30 µl in sterile plastic centrifuge tubes with 0.2 ml capacity. The amplification protocol (cycling programme) was defined as: 10' at 95 °C; 30 cycles of: 0' at 95 °C and 15" at 64 °C; and finally 1' at 72 °C. The PCR products thus obtained were purified with Centriscp® filtration columns in accordance with the manufacturer's instructions.

The sequencing reaction required a final volume of 20 µl for each sample: 13 µl sequencing kit (Microseq 500-Sequencing Kit®) plus 7 µl taken from the amplified and purified PCR products. At this point, samples were duplicated to take one fraction for the Forward and another for the Reverse reaction. The sequencing protocol consisted of: 1' at 96 °C; 25 cycles of: 10' at 96 °C, 5" at 50 °C and 1'15" at 60 °C; and finally 0' at 60 °C. Products from the sequencing reaction were purified as described in the preceding paragraph.

Each well of the ABIPRISM 3130- Applied Biosystems® was filled with 10 µl of the purified sequencing product, plus the same volume of formamide, to obtain a final volume of 20 µl.

This procedure enabled us to genetically identify each bacterial colony grown in the nutritive Agar culture media, after having been isolated from the original samples.

Sequences were processed and analysed following the procedures described previously. Sequences were removed from the analysis if they were less than 450 bp in length, had a quality score of less than 25 or did not contain a minimum identity of 99 %. For the statistical analysis of relationships and for the creation of family trees, we used the MEGA 4.0.1 program. Representative sequences were aligned using CLUSTAL 1.6©. A phylogenetic tree was inferred using Clearcut with the Maximum Composite Likelihood model. Taxonomy was assigned with a minimum support threshold of 60 %.

4.4 Results and Discussion

First, a similarity was observed between the colour of samples taken at depth (60–120 cm) and that of the soil sample adhering to the spade (Table 4.1). These deep samples should correspond to the same soil horizon. No differences were observed between the colour of samples taken at depth (60–120 cm) and that of the remnants of soil adhering to the spade. Differences between deep soil samples (60–120 cm) were however evident in the conductivity values (Fig. 4.3). pH analyses do not yield results with the power to discriminate between soil samples, although they can be useful for screening.

Particle size distribution curves for simple and cumulative percentage curves are presented in Fig. 4.3. The laser granulometry analysis showed that the particle size distribution and cumulative curves were very similar to each other, with the exception of the sample obtained at surface level. This difference was also observed in the higher percentage of silt and the D_{50} value obtained for the surface sample (Table 4.2). In samples taken from the profile of the burial vault, particle size distribution was observed to be very homogeneous at depth, and differed from the surface area.

The mineralogical results (Table 4.3) indicated the presence of the smectite clay group (montmorillonite) in the soil samples taken at depth (60–120 cm) and the soil adhering to the spade and green boots, which was not present in the other samples. In these samples, montmorillonite clay was more abundant than other types, whereas in the remaining samples illite was the most abundant type. This difference as

Table 4.1 Summary of results for soil colour, pH and conductivity

Sample	Colour <0.5 mm	Colour <2 μ m	pH 1:5	Conductivity mS/cm
Surface level	7.5 YR 5/3	10 YR 3/2	7.57	312.0
60 cm depth	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	7.99	260.7
120 cm depth	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	8.38	185.6
Spade	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	7.68	277.1
Green boots	7.5 YR 6/3	10 YR 6/2	6.91	450.0
Brown boots	7.5 YR 5/3	10 YR 6/2	7.39	422.0
Large mattock	7.5 YR 5/3	10 YR 6/2	–	–

4 Forensic Soil Analysis: Case Study of Looting at a Roman-Visigothic Burial Vault

55

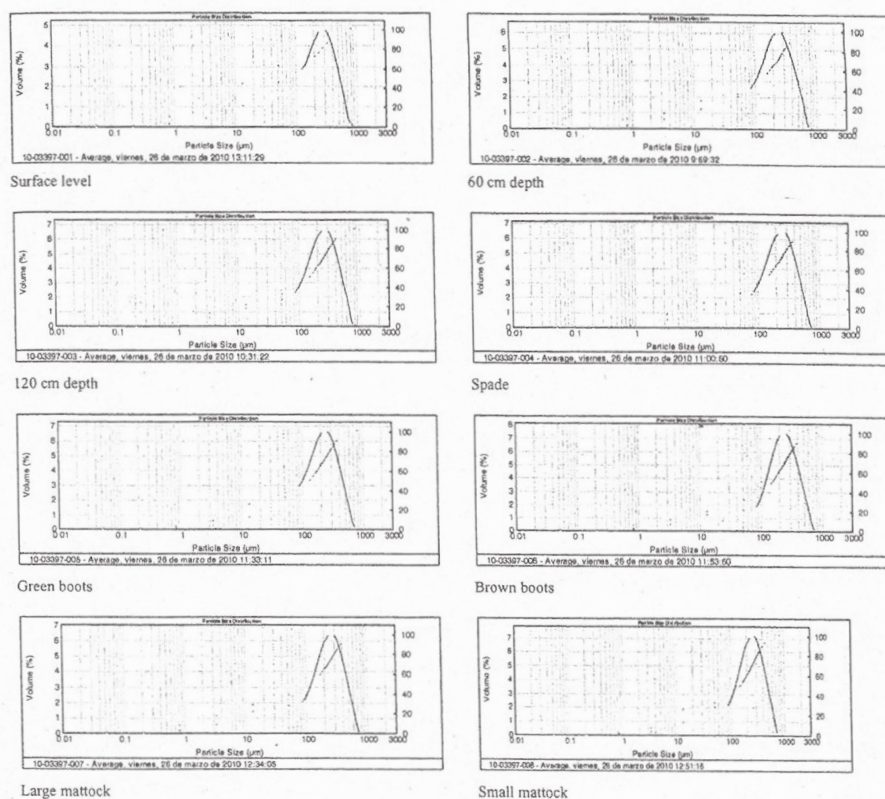


Fig. 4.3 Particle size distribution curves and cumulative percentage curves

Table 4.2 Results of particle size parameters determined by laser granulometry

Sample	Mean (μm)	D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	$D_{90} - D_{10}$ (μm)	% sand	% silt	% clay
Surface level	139.8	4.8	68.0	377.7	372.9	55.8	39.7	4.5
60 cm depth	162.3	4.9	123.2	390.9	386.0	64.9	30.1	5.0
120 cm depth	176.4	4.8	146.0	409.6	404.8	68.0	26.7	5.3
Spade	165.2	5.2	133.5	388.2	383.0	66.0	29.1	4.9
Green boots	162.6	11.0	131.5	371.8	360.8	68.8	29.6	1.6
Brown boots	175.0	6.6	155.2	390.5	383.9	69.0	27.4	3.6
Large mattock	161.5	4.3	126.3	389.3	385.0	62.7	32.2	5.1
Small mattock	181.3	11.4	156.5	407.5	396.1	69.1	29.7	1.2

Table 4.3 Mineralogy results obtained by x ray diffraction

Sample	Mineralogy				
Surface level	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	
60 cm depth	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	Montmorillonite
120 cm depth	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	Montmorillonite
Spade	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	Montmorillonite
Green boots	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	Montmorillonite
Brown boots	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	
Large mattock	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	
Small mattock	Quartz	Calcite	Illite	kaolinite	Dolomite

Table 4.4 Major and trace elements determined by ICP/OES (mg/Kg) and isotopic relationship determined by ICP/MS

Sample	Fe	Al	Mn	Zn	Ba	Cu	Cr	Ni	Pb	Cd	Co
Surface level	1200	2290	394	29.5	99.5	86.6	22.5	<10.0	17.7	<10.0	<10.0
60 cm depth	9760	18,400	435	15.8	102	19.3	15	<10.0	12.7	<10.0	<10.0
120 cm depth	10,200	17,300	496	15.4	159	17.1	14.1	<10.0	11.0	<10.0	<10.0
Spade	11,000	18,800	465	18.7	115	15.5	16	20.7	11.8	<10.0	<10.0
Green boots	7850	11,200	214	47.5	64.3	61.4	11.3	<10.0	<10.0	<10.0	<10.0
Brown boots	12,600	23,700	320	39.7	86.7	43	23.3	12.5	15.1	<10.0	<10.0
Large mattock	7340	7720	153	55.0	28.5	28.3	<10.0	<10.0	<10.0	<10.0	<10.0
Small mattock	13,500	2003	317	11.2	74.8	39.4	11.6	<10.0	11.2	<10.0	<10.0

regards the presence of an expansive clay (montmorillonite) distinguished these four samples from the rest.

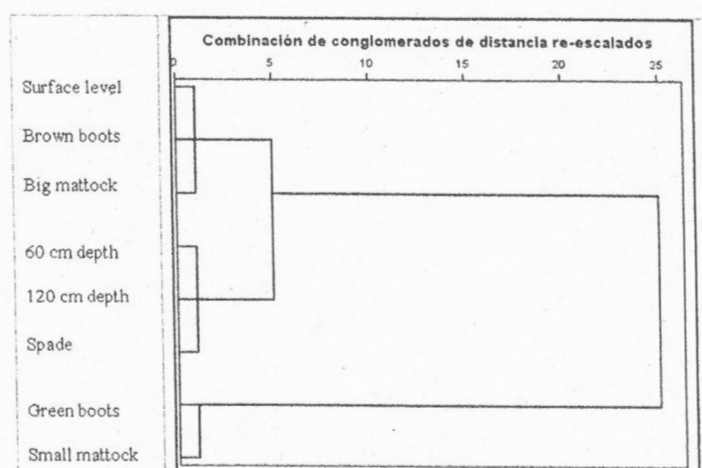
The results obtained by ICP/OES indicated that the concentrations of the elements Mn, Zn and Cu had a greater power of discrimination regarding the deep soil samples (60–120 cm) and that attached to the spade compared with the rest of the samples (Table 4.4).

In the light of the results obtained by IC, it was concluded that the surface level sample could be excluded from the other evidence (Table 4.5). These results were used to generate a hierarchical cluster dendrogram.

For a statistical analysis capable of sample discrimination, a hierarchical cluster analysis was performed using SPSS version 18.0. To this end, a combination of the quantitative data obtained was employed, including particle size, trace metal, anions, pH and conductivity. The number of clusters was determined using the

Table 4.5 Inorganic anion results obtained by IC (mg/l)

Sample	F	Cl	NO ₂	NO ₃	PO ₄	SO ₄
Surface level	<2	54.5	13	66	12.5	<20
60 cm depth	<2	289	>0.35	<10	<10	<20
120 cm depth	<2	<15	<0.35	<10	<10	<20
Spade	<2	38	<0.35	<10	<10	34
Green boots	<2	<15	<0.35	<10	114	206.5
Brown boots	<2	159.5	<0.35	<10	<10	68.5
Large mattock	–	–	–	–	–	–
Small mattock	<2	256.5	2.5	<10	175	547.5

**Fig. 4.4** Historical cluster dendrogram (Ward method) combining particle size distribution and chemical analysis

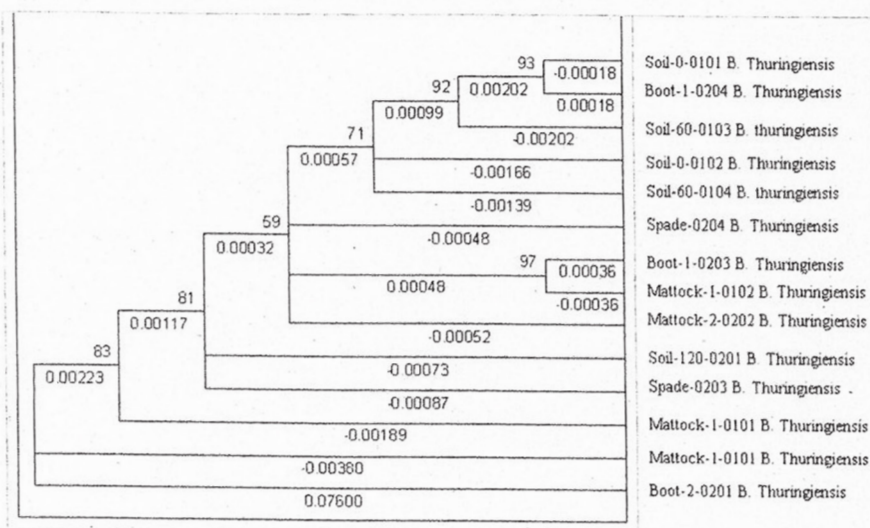
The dendrogram resulting from this classification of samples into relatively homogeneous and heterogeneous groups (cluster analysis) clearly demonstrates their similarity (Fig. 4.4).

The results of the qualitative and quantitative analyses indicated that the samples taken at depth (60–120 cm) and the soil adhering to the spade presented similarities as regards colour, distribution profile (granulometry), mineralogy and chemical composition. The dendrogram resulting from this classification of samples into relatively homogeneous and heterogeneous groups (cluster analysis) clearly demonstrates their similarity.

The principal results in support of this conclusion include the same chromatic colour (7.5 YR 7/2 pinkish gray) and mineralogy, since these samples presented an

Table 4.6 Results of the bacterial phylogenetic analysis

Sample	Identification
Surface level	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC10792; DSM6091).
60 cm depth	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC10792; DSM6091); <i>Enterobacter</i> sp.
120 cm depth	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679).
Spade	<i>Citrobacter braakii</i> (ATCC 51113); <i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679).
Green boots	<i>Escherichia coli</i> (ATCC53503); <i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679; ATCC10792).
Brown boots	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679; DSM6110).
Large mattock	<i>Bacillus thuringiensis</i> (DSM6110).
Small mattock	<i>Bacillus thuringiensis</i> (DSM6110).

Table 4.7 Phylogenetic relationships among the 27 specimen isolates studied

Coincident bacterial isolates were identified to species level in several of the samples. A bacterial phylogenetic analysis indicated statistically significant relationships between *Bacillus thuringiensis* isolates obtained from the surface level sample and the green boots (93 %), and from the 60 cm depth sample and the same boots (92 %). A close relationship (97 %) was also observed between isolates of *B. thuringiensis* obtained from the green boots and those from the small mattock (Tables 4.6 and 4.7).

The remaining site sample could not be excluded as a possible source of the soil recovered from the tools used to loot the burial site. Samples presented a strong match in terms of all comparison criteria used.

4.5 Conclusions

This case study illustrates the forensic analysis of soil carried out by the Guardia Civil Criminalistic Service. It also shows the importance of this analysis for the study of trace evidence in criminal investigations, due to its capacity to link a crime scene with the object used.

In soil forensics, where samples taken at the crime scene are compared with samples adhering to different objects in the possession of a suspect, the use of a combination of different geochemical and biological techniques is of great importance, in addition to the statistical treatment of the data obtained, in order to arrive at a conclusion about the relationships between samples. It should also be noted that the data obtained will depend on the amount of sample available and use of the most suitable techniques in order to obtain sufficient data to establish such relationships.

References

- Blott SJ, Croft DJ, Pye K, Saye SE, Wilson HE (2004) Particle size analysis by laser diffraction. *Forensic geoscience: principles, technique and applications*. *Geol Soc* 232:63–73
- Bommarito CR, Sturdevant AB, Szymanski DW (2007) Analysis of forensic soil sample via high-performance liquid chromatography and ion chromatography. *J Foren Sci* 52(1)
- Color M (1994) Munsell soil color charts. Gretag Macbeth, New Windsor
- Croft DJ, Pye K (2004) Colour theory and the evaluation of an instrumental method of measurement using geological samples for forensic application. *Forensic geoscience: principles, technique and applications*. *Geol Soc* 232:183–196
- Fitzpatrick FW, Raven MD, Forrester ST (2009) A systematic approach to soil forensics: criminal case studies involving transference from crime scene to forensic evidence. In: Ritz K, Dawson L (eds) *Criminal and environmental soil forensics*. Springer, London, pp 105–127, Chapter 8, ISBN 978-1-4020-9203-9
- Guedes A, Ribeiro H, Valentim B, Noronha F (2009) Quantitative colour analysis of Beach and dune sediments for forensic applications: a Portuguese example. *Forensic Sci Int* 190:42–51
- Pirrie D, Power MR, Rollinson GK, Wiltshire PEJ, Newberry J, Campbell HE (2009) Automated semi-eds (Qemscan) mineral analysis in forensic soil investigation: testing instrumental reproducibility. *Criminal Environ Soil Forensic*, 411–429
- Pye K (2007) *Geological and soil evidence*. CRC Press, Boca Raton
- Pye K, Blott SJ (2004) Comparison of soil and sediments using major and trace element data. *Forensic geoscience: principles, technique and applications*. *Geol Soc*, 183–196
- Pye K, Croft DJ (2004) *Forensic geoscience: introduction and overview*. *Forensic geoscience: principles, technique and applications*. *Geol Soc* 232:1–5
- Pye K, Croft DJ (2007) Forensic analysis of soil and sediment traces by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray analysis: an experimental investigation. *Forensic Sci Int* 165:52–63
- Pye K, Blott SJ, Croft DJ, Carter JF (2006) Forensic comparison of soil samples: Assessment of small-scale spatial variability in elemental composition, carbon and nitrogen isotope ratios, colour, and particle size distribution. *Forensic Sci Int* 163:59–80

Forensic Analysis of Soil: Case of Sacking of a Roman-Visigothic burial vault.

Enrique Santillana, Jose C. Cordero, Francisco Alamilla

E. Santillana, J.C. Cordero and F. Alamilla
Chemistry and Environment Department, Criminalistic Service of Guardia Civil. Guzmán el Bueno 110, 28003 Madrid (Spain)
Collaborators at University Institute of Investigation in Police Sciences (IUICP)-Alcalá de Henares University (Spain).
e-mail: ejasantillana@guardiacivil.es; jccordero@guardiacivil.es; falamilla@guardiacivil.es

El Servicio de Criminalística de la Guardia civil (España) reconoce el gran potencial del suelo como indicio en la investigación criminal, así como su fuerza como evidencia forense en los procedimientos judiciales, debido a su capacidad para relacionar la escena de un crimen con el sospechoso. Hay un promedio de 15 casos anuales que requieren análisis forense de suelos y que son procesados en nuestro laboratorio en el curso de investigaciones criminales. Un ejemplo es el caso de un expolio en una tumba arqueológica situada en Morón de la Frontera (Sevilla, España), donde el Servicio de Protección de la Naturaleza de la Guardia Civil (SEPRONA) recogió muestras de la tumba y de las botas y herramientas encontradas en el interior del maletero del vehículo sospechoso.

Este póster ilustra la metodología usada para el análisis forense de las muestras de suelo relacionadas con el expolio de este lugar arqueológico (color, distribución de tamaño de partículas, difracción de rayos x, elementos mayoritarios y trazas, EC, pH, aniones y filogenia genético-comparativa de microorganismos).

Los resultados fueron utilizados para identificar similitudes entre las muestras de suelo recogidas de las herramientas y botas encontradas en el vehículo del sospechoso y las muestras procedentes del yacimiento arqueológico Romano-Visigótico.

Introducción

Son abundantes los laboratorios que realizan estudios de suelos y de cualquier material geológico con fines criminalístico, como son: homicidios, violaciones, robos, terrorismo, etc., y en numerosos materiales, como zapatos, ruedas y bajos de vehículos, herramientas, etc. Los cuales consideran a estos como otro elemento de prueba en una investigación policial. La gran variabilidad en la distribución y en las propiedades de los suelos, junto con las técnicas aplicadas son capaces de caracterizar y discriminar los distintos suelos, haciendo de estos una herramienta importante en el campo criminalístico. En España son diversos los laboratorios policiales o institutos forenses que realizan análisis de restos de suelos encontrados en el lugar de los hechos como consecuencia de una investigación criminal.

Principalmente la mayoría de las evidencias trazas recogidas para cotejo, corresponden a sedimentos y partículas de suelo, las cuales son más fácil su transferencia entre objetos. Dentro de estas evidencias de material geológico se pueden clasificar en siete grupos, los cuales presentan fronteras mas o menos difusas entre sí: (1) rocas, (2) sedimentos, (3) suelos, (4) polvo, (5) minerales, (6) fósiles y (7) partículas (Pye 2007).

Este capítulo se centra en el estudio de cotejo de suelos debido a que es el principal material geológico transferido en un hecho delictivo y el mayoritario en los laboratorios criminalísticos. En general un suelo es una matriz compleja compuesta de componentes

minerales, materia orgánica, y organismos vivos y en descomposición, donde su composición depende la roca madre, el clima, los organismos presentes, la topografía y el tiempo. Mientras que la definición de suelo desde un punto de vista criminalístico se corresponde con los componentes de un suelo que constituyen una evidencia física de interés policial en la investigación de un acto delictivo.

Son muy diversas las técnicas utilizadas en el análisis criminalístico de suelos, las cuales son capaces de caracterizar una muestra de suelo y su cotejo con otra relacionada con un hecho criminal. Entre las técnicas más utilizadas podemos diferenciar tres grupos. El primero sería la identificación del suelo según características morfológicas y físicas (ej. color, tamaño de partículas, consistencia, etc.), así como de las propiedades de los distintos minerales presentes en el suelo (ej. forma de las partículas y textura de su superficie). Un segundo grupo entrarían las técnicas mineralógicas y químicas (ej. difracción de rayos X, técnicas cromatográficas y espectroscópicas, etc.). En tercer lugar incluiríamos el estudio de trazas biológicas (ej. microbiología, pólenes, etc.).

Hay que seguir una metodología exhaustiva para obtener la mayor cantidad de datos para una caracterización adecuada de las muestras a cotejar. La elección de las distintas técnicas analíticas depende principalmente de la disponibilidad de dichas técnicas en el laboratorio y de su poder de discriminación. Además hay que tener en cuenta otros factores como son: cantidad de muestra, elección adecuada de las fracciones (tamaño de partícula), técnicas destructiva/no destructiva y la obtención de datos cuantitativos/cualitativos.

La cantidad mínima de muestra, necesaria para realizar los análisis es un factor muy importante que limita la selección de las técnicas a utilizar, ya que en el campo forense, en la mayoría de ocasiones, la tierra recuperada de los objetos es muy escasa, limitándose en ocasiones a unos pocos miligramos de suelo. También es importante la elección de un tamaño de partícula adecuada para que los resultados sean representativos y cotejables con otras muestras de suelos, ya que a pesar de que el suelo sea homogéneo mineralógicamente, su composición química varía significativamente con el tamaño de grano y sílice, el cual es más abundante en las fracciones más gruesas, y de los metales trazas que se concentran principalmente en la arena fina, limo y arcilla (Pye and Blott 2004). Entre otros factores está que sea una técnica no destructiva, ya que con posterioridad podemos realizar otros análisis y por último la cuantificación que nos aporta datos numéricos cotejables mediante métodos estadísticos. En la mayoría de los casos en los que tengamos muestra suficiente, el método preferido de cotejo de suelos debería estar basado en la combinación de métodos que combine análisis cualitativos y cuantitativos.

Caso de expolio de un yacimiento arqueológico Romano-Visigótico.

El expolio de yacimientos arqueológicos constituye una actividad delictiva que contribuye al deterioro y destrucción del patrimonio nacional español, y que esta tipificado en nuestro Código Penal como delitos sobre el Patrimonio Histórico. Dichas actividades delictivas se dan en todo el territorio español, el cual es rico en restos arqueológicos, pero es Sevilla una de las provincias donde más se da este tipo de delito y donde más piezas se han incautado. El caso que se expone en este capítulo corresponde a un saqueo de una tumba Romano-Visigótica en Morón de la Frontera (Sevilla, Spain).

Debido a que la Guardia Civil tiene competencia en la mayoría de las zonas donde existen yacimiento arqueológicos, son muchas las investigaciones llevadas por nuestras unidades sobre este tipo de delitos. En el caso de las investigaciones den su fruto y localicemos a los

autores del hecho, se puede cotejar los restos de suelos adheridos a las piezas recuperadas o las herramientas utilizadas para excavar en dicho expolio. Podemos distinguir tres tipos de expoliadores: ocasionales, correspondiente a aficionados a buscar restos arqueológicos normalmente para su colección y utiliza medios rudimentarios. Un segundo lugar tenemos los habituales que están dedicados a esta actividad, que se mueven por motivos económicos y disponen de medios técnicos y materiales. Y por último, los llamados eruditos locales que son “aficionados a la arqueología, se suponen salvadores de la cultura local y desconocen las técnicas de excavación actuales” (www.guardiacivil.es/patrimonio/activ_princip.jsp).

El Servicio de Protección de la Naturaleza de la Guardia Civil (SEPRONA) inició una investigación policial en relación con un expolio en una tumba arqueológica (Romano-Visigótica) situada en Morón de la Frontera (Sevilla, España). Esta investigación dio como resultado la detención de unos sospechosos que habían merodeado unos días antes en la zona de aparición de dichos restos arqueológicos, requisándose en el maletero de estos distintos utensilios que pudieran haberse utilizado para la comisión de dicho acto delictivo. Entre los utensilios encontrados en el maletero se encontraron un par de botas verdes, otras marrones, una pala, una azada grande y otra pequeña con restos de tierra adheridos. Con los datos recogidos por la Unidad de la Guardia Civil decide realizar un muestreo del perfil del suelo de acceso a la tumba, las cuales serán remitidas junto a las tomadas del vehículo al Criminalistic Service of Guardia Civil para realizar un cotejo de suelos. En el muestreo de la fosa se toman tres muestras correspondiente a una muestra a 120 cm de profundidad, otra a 60 cm de profundidad y una última superficial (< 5 cm profundidad). El orden de la toma de muestras es de abajo a arriba para evitar contaminaciones cruzadas y en condiciones de esterilidad.



Fig. 1.-Roman Visigothic burial.



Fig. 2.- Green boots inside the suspect's vehicle

Metodología

Debido a la suficiente cantidad de tierra recibida de cada una de las evidencias es posible realizar una gran variedad de técnicas analíticas para realizar un cotejo muy completo, con el que podemos llegar a la conclusión de similitud o disimilitud entre las muestras dudosas e indubitadas recibidas en el laboratorio.

El primer paso la búsqueda de materiales extraños que puedan caracterizarlas mediante el estero-binocular Light microscopy. Después se procede a su secado a temperatura ambiente y a una separación de muestra para realizar un estudio por dos vías complementarias, por lo que se tomó una submuestra de 1 gr. para el estudio microbiológico y el resto para un estudio geoquímico, sobre la cual se realizarán los estudios físicos y químicos necesarios para caracterizar las muestras.

Las técnicas analíticas empleadas para analizar las propiedades del suelo para cotejo forense fueron: color, distribución de tamaño de partículas, análisis elemental, difracción de rayos x, elementos mayoritarios y trazas, EC, pH, aniones y filogenia genético-comparativa de microorganismos mediante la secuenciación del rDNA16S bacteriano).

Color del suelo utilizando las tablas de Munsell.

El color es una propiedad del suelo que ha sido aplicada en investigación forense y también aplica a un potencialmente poderoso método para la discriminación de muestras (Pye et al. 2004). Básicamente dos métodos identificativos son utilizados: las tablas de color de Munsell y la espectrofotometría. Los diferentes estándares de color de las Tablas de Munsell (Munsell 1994) pueden ser expresados como combinación de tres parámetros: Hue (H), que indica su relación con el rojo, amarillo, verde, azul y violeta; Value (V) indica su luminosidad y Chroma (C), que indica su intensidad; de cualquier modo este sistema puede ser considerado subjetivo dependiendo de la percepción del color por el observador.

Con el espectrofotómetro de color se puede cuantificar, por lo que es una técnica reproducible y exenta de la subjetividad de las tablas Munsell. El espectrofotómetro de color está basado en el sistema de color $L^*a^*b^*$, donde L representa la luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad.

Hay que tener en cuenta que las variaciones de color dependen del tamaño de grano, cantidad de materia orgánica, humedad, por lo que diversos autores proponen mediciones de color después de distintos tratamientos (secado, calcinación, eliminación de materia orgánica u óxidos) (Sugita and Marumo 1996) y en distintas fracciones. Entre las fracciones que se proponen y que mejor discriminación entre muestras es la medida de muestra seca y sin tamizar junto con el secado y tamizado a $<150 \mu\text{m}$ (Croft and Pye 2004) (Guedes et al. 2009).

La determinación del color de un suelo se realizó mediante "The Munsell Soil Color Charts, las cuales conllevan un grado de subjetividad debido a la apreciación del observador, debido a que en esos momentos no se contaba con un espectrofotómetro de color.

Las medidas de color se realizaron dos fracciones de suelo. La primera corresponde a la muestra seca y tamizada a $<0.5 \text{ mm}$ y la $<2 \mu\text{m}$ que corresponde a la extraída para el estudio de la fracción arcilla mediante agregados orientados por Difracción de rayos X.

Distribución del tamaño de partículas mediante granulometría laser.

Muchos métodos han sido utilizados para determinar la distribución de tamaño de partícula, incluyendo la observación directa (microscopio), análisis de imágenes, tamizados en seco y húmedo, método del hidrómetro, etc., pero el más reproducible es la difracción láser, especialmente para fracciones de arena, limo y arcilla, siendo la más utilizada la fracción <150 μm (Pye et al. 2006). Para determinar proporciones de arena y grava es mejor utilizar el tamizado seco o húmedo.

Las muestras fueron analizadas para determinar las características de la distribución de tamaño de partícula utilizando el equipo Mastersizer 2000, con un módulo de dispersión vía líquida Hydro 2000G (modelo de Mie).

En este caso las muestras fueron previamente procesadas con un tamiz < 150 μm , ya que es la fracción que nos da mayor reproducibilidad (Blott et al. 2004).

Se tomaron tres submuestras (aprox. 400 mg cada una) de cada una de las muestras objeto de estudio, previamente tamizadas y homogenizadas, las cuales se echan en un erlenmeyer al que añadimos 50 ml de una solución dispersante de hexametáfosfato de sodio al 2% durante 1h. Se utiliza como dispersante el agua y ultrasonido durante 90 s previo a la medida.

Para la discriminación entre muestras se utilizaron las siguientes statistical measures, including the percentage of sand, silt and clay, mean, median, D_{10} - D_{90} (Blott et al. 2004). Además de observar las curvas de distribución y el porcentaje acumulativo.

Análisis cualitativo de la muestra y fracción arcilla mediante DRX.

La difracción de rayos X (DRX) es una de las técnicas más importantes en la identificación de sustancias cristalinas, cuyas principales ventajas son: es una técnica no destructiva, posibilidad de análisis de pequeña cantidad de muestra, mínima preparación de muestra y posibilidad de distinguir entre elementos y sus óxidos, así como de formas polimórficas y mezclas de sustancias cristalinas. Se pueden realizar ensayos cualitativos y cuantitativos, siendo una importante herramienta en la discriminación de suelos (Fitzpatrick et al 2009).

Los análisis de difracción de rayos X se realizan sobre la fracción sin tamizar o sobre las distintas fracciones. También se puede realizar una identificación de los minerales de la arcilla presentes en los suelos. Dentro de las arcillas encontramos los siguientes grupos: (1) grupo de la serpentina-caolinita (serpentina, crisotilo, caolinita; dickita y haloysita) (2) grupo de la illita/mica (politipos de illita, mica y glaucomita); (3) grupo de la clorita (chanosita y clinocloro); (4) grupo de la esmectita (montmorillonita, nontronita y saponita); (5) grupo de la vermiculita; (6) minerales interstratificados (ej. illita-esmectita, clorita-esmectita, etc.); (7) grupo sepiolita-paligorskita; (8) grupo del talco-pirofilita; y (9) grupo de la imogolita-alofana (Pye et al. 2007). El estudio cualitativo de las arcillas se realiza previo estudio de las modificaciones de las distancias interplanares 001 como consecuencia de la saturación con elementos alcalinotérreos Mg^{2+} y K^+ y ciertos compuestos orgánicos (glicerol, etilenglicol y DMSO). También es necesario tratarlos térmicamente para diferenciar ciertos minerales de la arcilla, en los cuales se producen variaciones en el espaciado basal, desaparición de la red o de ciertas líneas de difracción.

La ventaja de cuantificación mediante difracción de rayos X es la posibilidad de estudio estadístico y su comparación entre los resultados de la muestra dubitada e indubitada. Aunque lo ideal es la compaginación de la difracción cualitativa y cuantitativa (Ruffell et al. 2004).

Los análisis de difracción de rayos X (Bruker Advance) se realizaron sobre la fracción < 2 mm y < 0.5 mm (al azar). Los difractogramas fueron obtenidos utilizando un goniómetro vertical y un barrido de 3° a 70° en 0.05° 2θ/min. El difractómetro fue utilizado en reflexión, 40 Kv y 40 mA.

También se realizó un estudio en la fracción arcilla (< 2μ), previamente extraída mediante decantación y orientación de agregados organizados. El estudio de las arcillas se realizó respecto a las modificaciones de las distancias interplanares 001, como consecuencia de la saturación con elementos alcalinotérreos Mg^{2+} y K^+ y compuestos orgánicos (etilenglicol), así como tratamiento térmico (400°C y 550°C). Previamente al estudio de las arcillas se han eliminado los carbonatos mediante un tapón 1N ácido acético/acetato de sodio tri-hidratado a pH=5. Los difractogramas fueron obtenidos mediante un goniómetro vertical y un barrido de 2° a 30° en 0.05° 2θ/min. El difractómetro fue utilizado en reflexión, 40 Kv y 40 mA.

Análisis elemental mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX)

El análisis mediante el microscopio electrónico de barrido proporciona información sobre el tamaño, forma, textura superficial y composición elemental de partículas individuales, las cuales pueden ser menores de 3 μm o menos, así como la realización de un análisis general de la muestra para la obtención de la composición elemental de los minerales presentes.

La cantidad de muestra necesaria para este tipo de análisis es bastante pequeña, por lo que con una pequeña cantidad de arena fina podemos obtener cientos de partículas de las cuales podemos obtener cientos de datos cuantitativos para cotejo. La fracción más adecuada y que menos variabilidad es la de <150 μm (Pye et al. 2007) (Pirrie et al. 2009).

En este caso se hizo una composición elemental de la muestra < 0.5 mm utilizada en la difracción de rayos X y que fue previamente pulverizada. El experimento utilizado fue un voltaje acelerado de 25 Kv, emission current de 60 μA, 5.10^{-6} mbar, superficie scan de 500 x amplificación y 10 spot mode análisis tomado sobre una superficie de 200 μm².

Composición de elementos traza y mayoritarios mediante espectrometría de masas mediante acoplamiento de plasma inductivo (ICP-OES).

Se realizó el estudio de elementos traza y mayoritarios mediante un optical emission spectrometry (ICP-OES) de Perkin Elmer (Optima 3200 DV), cuya calibración y análisis con estándar interno (Sc) en línea, previa digestión ácida de las muestras asistida por microondas, utilizando la fracción <150 μm, la cual en la mayoría de los casos en la fracción más adecuada para la discriminación entre muestras (Pye and Blott 2004), (Pye et al 2006). Se realizan tres réplicas por muestra, tomando una cantidad de 100 mg por cada una.

La digestión de la muestra de suelo (<150 μm) se realiza con ácido nítrico de calidad ultraza, equipo Ethos One de Milestone, a 180°C durante 15min. Todo el material se ha lavado previamente con una solución de 0.5 % de ácido nítrico y enjugando finalmente con agua destilada.

Concentración de aniones por cromatografía iónica (IC)

La concentración de aniones en un suelo, tales como cloruros, sulfatos, nitratos, bicarbonatos, fosfatos, fluoruros y bromuros proporcionan datos para un estudio medioambiental o de uso

del suelo, pero además puede ser utilizado para un cotejo de suelos en una investigación criminal. En general para los análisis de rutina de suelos la fracción más adecuada y que mejor discriminación es la de $< 250 \mu\text{m}$ (Bommarito et al. 2007).

La determinación de aniones en las muestras de suelo se realizó mediante ionic chromatography (Dionex LC20) previa lixiviación con agua milli-Q en proporción 1:5, centrifugado a 1500 r.p.m durante 10 min y filtrado del sobrenadante con filtro PTFE de $0.20 \mu\text{m}$. La fracción mineral utilizada correspondió a $< 250 \mu\text{m}$.

Otras técnicas analíticas

Otras técnicas muy utilizadas en la caracterización de suelos y que pueden ser utilizadas como parámetros de cotejo son: (1) pH, el cual nos indica que tipo de suelo corresponde (ácido o básico), (2) Conductividad eléctrica (EC), medida de la concentración de iones en solución (sales disueltas). La determinación de pH y conductividad sobre el extracto 1:5 masa/volumen, según las normas UNE 77305 y UNE 77308.

rDNA 16S Sequencing and Microbial Communities Comparisons.

Based on samples from soils, boots, spades and hoes, microbiological analysis were performed using the pre-enriching technique in non-selective culture (peptone saline – Cultimed© – 0.1%) incubated for 24 hours at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ and subsequent sowing for extension of $20 \mu\text{l}$ per plate in general culture media (nutritive agar-Cultimed ©) incubated another 24 hours at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ to obtain bacterial isolates. Individualized diagnosis through bacterial rDNA 16S, according with the extraction, amplification and sequencing protocols established by the Fast Microseq 500 © Kit of Applied Biosystems. An ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer© sequencer was used for automatic detection. The identification of the obtained sequences was carried out with the help of Microseq ID Manager© Software.

Extracción.

A partir de las colonias microbianas aisladas, picamos cada uno de los morfotipos distintos obtenidos y los introducimos en un tubo de centrifuga con capacidad nominal de 1,5 ml, en donde hemos añadido previamente $100 \pm 3 \mu\text{l}$ del reactivo de extracción con la pipeta automática calibrada de $200 \mu\text{l}$. Estas muestras se incuban en el baño termostático a una temperatura de $100 \pm 3^\circ\text{C}$, medida con el termómetro, durante 10 minutos medidos con el temporizador. Transcurridos este tiempo, las muestras se homogenizarán durante 20 segundos medidos con el temporizador, con ayuda del vortex a una velocidad de 2500 rpm. rpm, para posteriormente ser centrifugadas durante 3 minutos a una velocidad de 13000 rpm.

Tras la centrifugación, nos quedaremos solo con $75 \pm 2,25 \mu\text{l}$ de sobrenadante final. De esta cantidad, únicamente $5 \pm 0,15 \mu\text{l}$, serán llevados a un tubo de centrifuga con capacidad nominal de 1,5 ml, en el cual se ha añadido un volumen total de $495 \pm 14,85 \mu\text{l}$ de agua con ayuda de la pipeta automática de $1000 \mu\text{l}$. De esta forma, llegaremos a un volumen

final de $500 \pm 15 \mu\text{l}$ (dilución 1:100), la cual se homogenizará durante $20 \pm$ segundos con el temporizador, a una velocidad de 2500 rpm con ayuda del vórtex.

rDNA 16S (500bp) amplificación. La amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consiste en la replicación una y otra vez de un mismo fragmento específico de ADN. Para ello es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar. Este sistema utiliza un par de oligonucleótidos que permiten amplificar un fragmento de 500 bp (pares de bases) mediante la PCR, correspondiente al extremo 5' del ADNr 16S. Este proceso se realiza mediante el termociclador.

Para ello se procede de la siguiente manera: se toman con ayuda de la pipeta automática de $20 \mu\text{l}$, $15 \pm 0,45 \mu\text{l}$ de la dilución 1:100 y $15 \pm 0,45 \mu\text{l}$ del reactivo de amplificación, obteniendo un volumen final para cada una de las muestras de $30 \pm 0,9 \mu\text{l}$ en tubos de plástico de centrifuga estériles, de capacidad nominal de 0,2 ml.

Sequencing reaction La reacción de secuenciación es una reacción de amplificación, que utiliza un iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. Este proceso se realiza mediante el termociclador.

Para la reacción de secuenciación se requiere un volumen final (para cada muestra) de $20 \mu\text{l}$: $13 \pm \mu\text{l}$ del kit de secuenciación y $7 \pm 0,21 \mu\text{l}$ resultantes de la purificación de la amplificación de los productos de la PCR. Estos volúmenes se añaden con la pipeta de $20 \mu\text{l}$. En este punto las muestras se duplican, por una parte se prepara la reacción para la cadena adelantada (Forward) y por otra parte la reacción para la cadena retrasada (Reverse).

Sequences were processed and analyzed following the procedures described previously. Sequences were removed from the analysis if they were less than 450bp in length, had a quality score less than 25 or did not contained a minimum identity of 99%. For the statistical analysis of relationships and for the creation of family trees we used MEGA 4.0.1 program. Representative sequences were aligned using CLUSTAL 1.6©. A phylogenetic tree was inferred using Clearcut with Maximum Composite Likelihood model. Taxonomy was assigned with a minimum support threshold of 60%.

Results and discusión

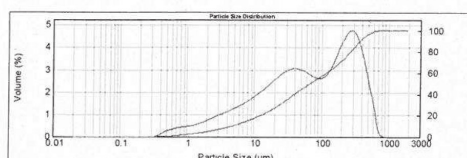
En un principio se observa una relación de color entre las muestras tomadas en profundidad (60 cm and 120 cm) y la muestra de suelo adherida a la pala (Fig. 3). Dichas muestras en

profundidad deberían corresponder al mismo horizonte edáfico. No se encuentran diferencias respecto al color de las muestras en profundidad (60 cm and 120 cm) respecto a los restos de suelo adheridos a la pala. Esta diferencia de las muestras de suelo en profundidad (60 cm and 120 cm) se evidencia en los valores de conductividad (Fig. 3). El análisis de pH no aporta resultados que tengan un poder de discriminación entre muestras de suelos, aunque nos puede servir como screenig.

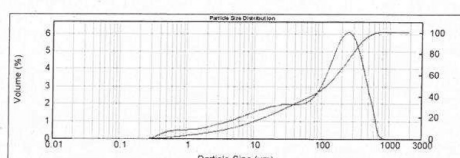
Sample	Colour < 0.5 mm	Colour < 2 μ m	pH 1:5	Conductivity mS/cm
Surface level	7.5 YR 5/3	10 YR 3/2	7.57	312.0
60 cm depth	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	7.99	260.7
120 cm depth	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	8.38	185.6
Spade	7.5 YR 7/2	10 YR 4/2	7.68	277.1
Green boots	7.5 YR 6/3	10 YR 6/2	6.91	450.0
Brown boots	7.5 YR 5/3	10 YR 6/2	7.39	422.0
Big hoe	7.5 YR 5/3	10 YR 6/2	-	-
Small hoe	7.5 YR 6/4	10 YR 6/2	7.17	624.0

Fig. 3.- Sumary results of soil color, pH and conductivity

Grain size distribution curves of simple and cumulative percentage curves are presented in Fig.4. The analysis by laser granulometry showed that the grain size distribution curve and cumulative were very similar to each other, with the exception of the sample analysed from de la zona superficial Esta diferencia también se observa en el mayor porcentaje de silt y el valor de D_{50} obtenidos en la muestra superficial (Fig. 5). Las muestras tomadas en el perfil de la fosa se observa una distribución de tamaño de partícula muy homogénea en profundidad y que difiere con la zona superficial.



Surface level



60 cm depth

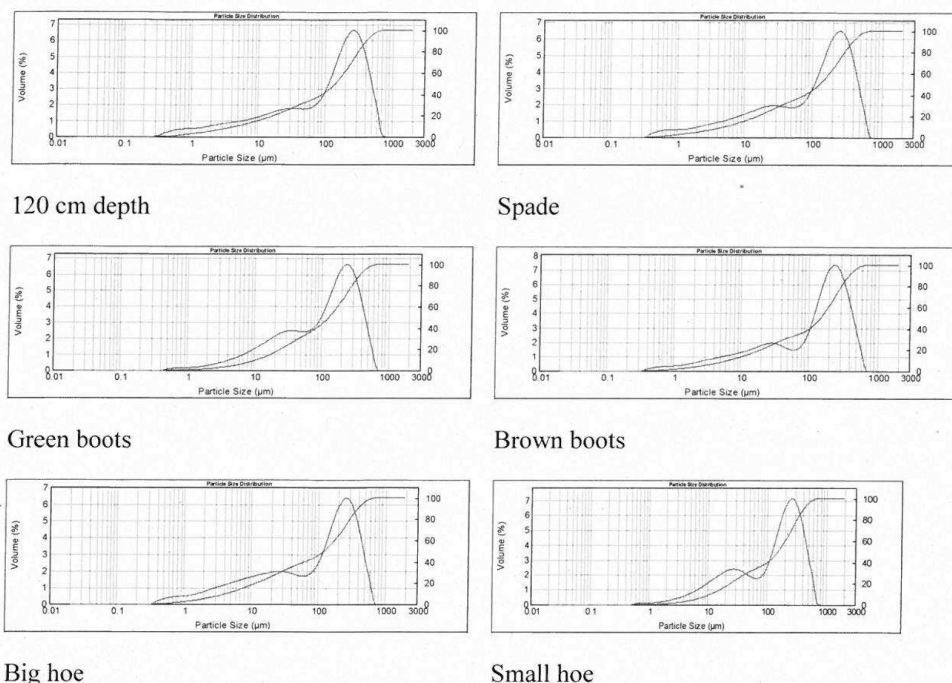


Fig.4.-: Grain size distribution curves and cumulative percentage curves.

Sample	Mean (μm)	D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	$D_{90}-D_{10}$ (μm)	% sand	% silt	% clay
Surface level	139.8	4.8	68.0	377.7	372.9	55.8	39.7	4.5
60 cm depth	162.3	4.9	123.2	390.9	386.0	64.9	30.1	5.0
120 cm depth	176.4	4.8	146.0	409.6	404.8	68.0	26.7	5.3
Spade	165.2	5.2	133.5	388.2	383.0	66.0	29.1	4.9
Green boots	162.6	11.0	131.5	371.8	360.8	68.8	29.6	1.6
Brown	175.0	6.6	155.2	390.5	383.9	69.0	27.4	3.6

boots

Big hoe	161.5	4.3	126.3	389.3	385.0	62.7	32.2	5.1
Small hoe	181.3	11.4	156.5	407.5	396.1	69.1	29.7	1.2

Fig.5- Results of participle size parameters determinate by laser granulometry.

Los resultados mineralógicos (Fig. 6) destaca la presencia arcilla del grupo de las smectite (montmorillonite) en las evidencias de suelo en profundidad (60 cm and 120 cm) la adherida a la pala y a las botas verdes, la cual no está presente en el resto de muestras. En estas muestras la montmorillonita es la arcilla más abundante respecto al resto, mientras que en el resto de muestras la más abundante es la illita. Está diferencia respecto a la presencia de una arcilla expansiva (montmorillonite) hace que estas cuatro evidencias sean excluidas del resto.

Sample	Mnineralogy				
Surface level	quartz	calcite	illite	kaolinite	
60 cm depth	quartz	calcite	illite	kaolinite	montmorillonite
120 cm depth	quartz	calcite	illite	kaolinite	montmorillonite
Spade	quartz	calcite	illite	kaolinite	montmorillonite
Green boots	quartz	calcite	illite	kaolinite	montmorillonite
Brown boots	quartz	calcite	illite	kaolinite	
Big hoe	quartz	calcite	illite	kaolinite	
Small hoe	quartz	calcite	illite	kaolinite	dolomite

Fig.6.- Mineraloy results by x ray diffraction.

Los resultados obtenidos mediante ICP/OES se observa que las concentraciones de los elementos de Mn, Zn y Cu tienen un mayor poder de discriminación de las muestras de suelo en profundidad (60 cm and 120 cm) y la adherida a la pala respecto al resto de muestras (Fig. 7).

Los resultados obtenidos mediante IC se llega a la conclusión exclusión de la muestra superficial del resto de evidencias (Fig. 8). Dichos resultados son utilizados para realizar el hierarchical cluster dendogram.

Sample	Fe	Al	Mn	Zn	Ba	Cu	Cr	Ni	Pb	Cd	Co
Surface level	1200	2290	394	29,5	99,5	86,6	22,5	<10,0	17,7	<10.0	<10.0
60 cm depth	9760	18400	435	15,8	102	19,3	15	<10,0	12,7	<10.0	<10.0
120 cm depth	10200	17300	496	15,4	159	17,1	14,1	<10,0	11,0	<10.0	<10.0
Spade	11000	18800	465	18,7	115	15,5	16	20,7	11,8	<10.0	<10.0
Green boots	7850	11200	214	47,5	64,3	61,4	11,3	<10,0	<10,0	<10.0	<10.0
Brown boots	12600	23700	320	39,7	86,7	43	23,3	12,5	15,1	<10.0	<10.0
Big hoe	7340	7720	153	55,0	28,5	28,3	<10,0	<10,0	<10,0	<10.0	<10.0
Small hoe	13500	20000	317	11,2	74,8	39,4	11,6	<10,0	11,2	<10.0	<10.0

Fig. 7.- Major and trace elements by ICP/OES (mg/Kg) and isotopic relation by ICP/MS

Sample	F	Cl	NO ₂	NO ₃	PO ₄	SO ₄
Surface level	< 2	54.5	13	66	12.5	< 20
60 cm depth	< 2	289	< 0.35	< 10	< 10	< 20
120 cm depth	< 2	< 15	< 0.35	< 10	< 10	< 20
Spade	< 2	38	< 0.35	< 10	< 10	34

Green boots	< 2	< 15	< 0.35	< 10	114	206.5
Brown boots	< 2	159.5	< 0.35	< 10	< 10	68.5
Big hoe	-	-	-	-	-	-
Small hoe	< 2	256.5	2.5	< 10	175	547.5

Fig. 8.-: Inorganic anions results by IC (mg/l).

Como análisis estadístico que sea capaz de discriminar muestras se utilizó un Hierarchical cluster analysis del programa estadístico SPSS (18.0). Para dicha discriminación se utilizaron la combinación de los datos cuantitativos obtenidos del tamaño de partículas, trace metal, aniones, pH y conductividad. El número de clusters fue determinando usando the Euclidean distance as a distance measure and the Ward method as a linking method.

De la clasificación de grupos relativamente homogéneos y heterogéneos entre ellos (análisis de cluster o conglomerados), se observa en el dendrograma la similitud entre dichas evidencias (Fig.10).

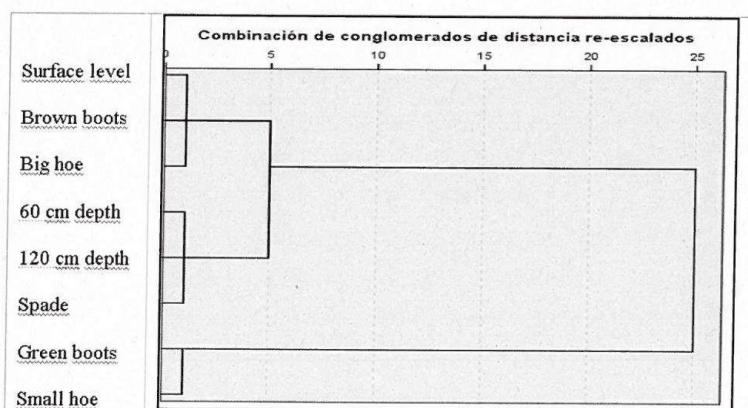


Fig. 9.- Historical cluster dendrogram (ward method) combining particle size distribution and chemical analysis.

De los análisis cualitativos y cuantitativos se llega a la conclusión que las muestras en profundidad (60 cm and 120 cm) y tierra adherida a pala presentan similitudes respecto al color, perfil de distribución (granulometría), mineralogía y composición química. De la

clasificación de grupos relativamente homogéneos y heterogéneos entre ellos (análisis de cluster o conglomerados), se observa en el dendograma la similitud entre dichas evidencias.

Entre los resultados a destacar para afianzar dicha conclusión son los siguientes: mismo color cromático (7.5 YR 7/2 gris rosáceo); mineralogía, ya que dichas evidencias presentan una arcilla expandible (montmorillonita) que aparece en las capas en profundidad del perfil de la fosa.

Se identificaron aislados bacterianos coincidentes a nivel especie en varias de las evidencias. Del análisis filogenético bacteriano se observaron un parentesco estadísticamente significativo (93%) entre aislados de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a las tierras superficial y botas de color verdes, así como del 92% entre el obtenido de la muestra de 60 cm profundidad y las mencionadas. Además se observa la estrecha relación de parentesco (97%) entre aislados de *B. thuringiensis* obtenidos de las botas de color verde y la azada de pequeño tamaño (Fig. 10 y 11).

Sample	Identification
Surface level	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC10792; DSM6091).
60 cm depth	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC10792; DSM6091); <i>Enterobacter</i> sp.
120 cm depth	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679).
Spade	<i>Citrobacter braakii</i> (ATCC 51113); <i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679).
Green boots	<i>Escherichia coli</i> (ATCC53503); <i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679; ATCC10792).
Brown boots	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 33679; DSM6110).
Big hoe	<i>Bacillus thuringiensis</i> (DSM6110).
Small hoe	<i>Bacillus thuringiensis</i> (DSM6110).

Fig. 10.-. Results

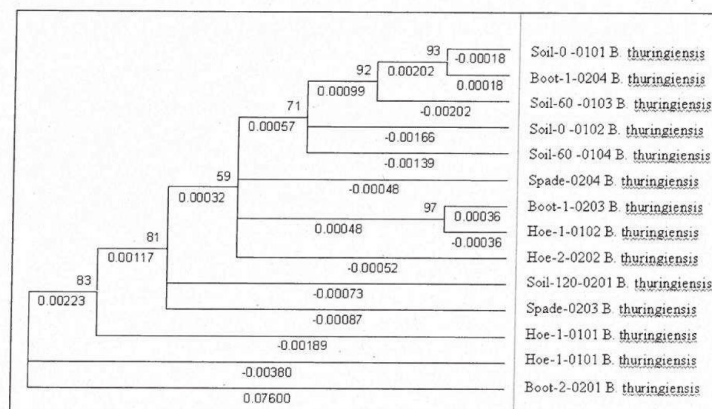


Figure 11.- Phylogenetical relationships among the 27 specimens isolates studied.

The remaining site sample cannot be excluded as possible source of the soil recovered from the tools used to sack the burial site. Samples have a strong match in term of all comparison criteria used.

Conclusion

This case work illustrates the forensic analysis of soil carried out by the Criminalistic Service of Guardia Civil. It also shows the importance of this analysis for trace evidence study in criminal investigations, due to its capability to link a crime scene with the object used.

Es importante en el estudio forense de suelos, donde cotejamos las muestras tomadas en el escenario de un crimen con las muestras adheridas en distintos soportes de un sospechoso, la combinación de distintas técnicas geoquímicas y biológicas, además del tratamiento estadístico de los datos obtenidos podemos llegar a una conclusión sobre la relación de dichas muestras. Es importante tener en cuenta que los datos que podemos obtener dependen de la cantidad de muestra obtenida y de la técnica más adecuada para obtener la mayor cantidad de datos que nos permitan establecer dichas relaciones.

References

- Blott, S.J., Croft, Pye, K.,D.J. ,Saye S.E and Wilson H.E.. Particle size analysis by laser diffraction. Forensic Geoscience: Principles, Technique and Applications. The Geological Society, 63-73 (2004).
- Bommarito C.R., Sturdevant A.B.and Szymanski D.W. Analysis fo Forensic Soil Sample Via High-Performance Liquid Chromatography and Ion Chromatography. Journal of Forensic Sciences 52 (1) (2007).
- Croft D.J. and Pye K. Colour theory and the evauation of an instrumental method of measurement using geological samples for forensic application. Forensic Geoscience: Principles, Technique and Applications. The Geological Society, 183-196 (2004).

- Guedes A., Ribeiro H., Valentim B. and Noronha F.. Quantitative colour analysis of beach and dune sediments for forensic applications: A Portuguese example. *Forensic Science International* 190, 42-51 (2009).
- Fierer et al. Forensic identification using skin bacterial communities. *PNAS*, vol. 107 -no. 14 -6477-6481 (April 6, 2010). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000162107.
- Fitzpatrick F.W, Raven M.D and Forrester S.T. A systematic approach to soil forensics: criminal case studies involving transference from crime scene to forensic evidence. *Criminal and environmental soil forensics*. Rits et al (eds.) and Springer (2009).
- Horswell J, Cordiner S.J, Maas EW, Martin TM, Sutherland BW, Speir TW, Nogales B and Osborn AM. Forensic comparison of soils by bacterial community DNA profiling. *Journal of Forensic Sciences* 47:350-353 (2002).
- Munsell Color, Munsell Soil Color Charts. Gretag Macbeth, New Windsor, 1994
- Pirrie D, Power M.R., Rollinson G.K., Wiltshire P.E.J., Newberry J. And Campbell H.E. Automated sem-eds (Qemscan) mineral analysis in forensic soil investigation: testing instrumental reproducibility. *Criminal and Environmental Soil Forensic*, 411-429 (2009).
- Pye, K. *Geological and Soil Evidence*. CRC Press (2007).
- Pye K. and Croft D.J. Forensic geoscience: introduction and overview. *Forensic Geoscience: Principles, Technique and Applications*. The Geological Society, 1-5 (2004).
- Pye, K., Blott, S.J., Croft, D.J. and Carter, J.F. . Forensic comparison of soil samples: Assessment of small-scale spatial variability in elemental composition, carbon and nitrogen isotope ratios, colour, and particle size distribution. *Forensic Science International*, 163, 59-80 (2006).
- Pye K and Blott, S.J. Comparison of soil and sediments using major and trace element data. *Forensic Geoscience: Principles, Technique and Applications*. The Geological Society, 183-196 (2004).
- Pye K. and Croft D.J. Forensic analysis of soil and sediment traces by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray analysis: An experimental investigation. *Forensic Science International*, 165, Issue 1, 5 January, 52-63 (2007).
- Ruffell A., Wiltshire P., Cojuntive use of quantitative and qualitative X-ray diffraction analysis of soils and rocks for forensic analysis. *Forensic Science International*, 145, 13-23 (2004).
- Sorokin et al. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72 n° 29, 1569-1578 (2006).
- Sugita R. and Marumo Y. Validity of color examination for forensic soil identification. *Forensic Science International*, 183, 201-210 (1996).

UNE 77305 Determinación del pH (abril 1999).

UNE 77308 Determinación de conductividad eléctrica específica (enero 2001).

www.guardiacivil.es/patrimonio/activ_princip.jsp

